

FABIANO SANDRINI

**TUMOR ADRENOCORTICAL EM CRIANÇAS:
AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO COM CÂNCER EM
FAMILIARES E COM ALTERAÇÕES NO GENE TP53**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação — Mestrado em Pediatria, da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, para a obtenção do título de Mestre em Pediatria.

Orientador: Prof. Romolo Sandrini

CURITIBA
1999



Parecer

Parecer conjunto dos Professores: *Dr. Luiz de Lacerda Filho* *Dr. Ayrton Custódio Moreira* e o *Dr. Juarez Gabardo*, sobre a dissertação: **"TUMOR ADRENOCORTICAL EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO COM CÂNCER EM FAMILIARES E COM ALTERAÇÕES NO GENE P53"**, a nível de Mestrado em Pediatria, do aluno: *Dr. Fabiano Sandrini*, do Curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria da Universidade Federal do Paraná.

A Comissão Examinadora considerou que o *Dr. Fabiano Sandrini*, apresentou trabalho adequado para a dissertação a nível de Mestrado em Pediatria e defendeu convenientemente as arguições que lhes foram feitas, atribuindo-lhes as seguintes notas:

<i>Prof. Dr. Luiz de Lacerda Filho</i>	<i>Nota (100) e Conceito "A"</i>
<i>Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira</i>	<i>Nota (100) e Conceito "A"</i>
<i>Prof. Dr. Juarez Gabardo</i>	<i>Nota (100) e Conceito "A"</i>

Tendo o candidato sido aprovado com *Média Final (100) e Conceito "A"* sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná, a concessão de título de "Mestre em Pediatria" e a publicação da dissertação em veículo de divulgação conveniente.

Curitiba, 22 de março de 1999

Prof. Dr. Luiz de Lacerda Filho

Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira

Prof. Dr. Juarez Gabardo

*Dedico este trabalho a meus pais, Vilson e Rosita, pelo carinho e exemplo de vida.
À Caroline, pelo apoio e paciência.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Romolo Sandrini Neto, pela preocupação em transmitir conhecimentos, pelo incentivo à ciência, pela orientação deste trabalho.

Ao Professor Luiz de Lacerda Filho, pelos ensinamentos em Endocrinologia, pelo seu apoio aos jovens pesquisadores.

Ao Professor Juarez Gabardo, pelos seus ensinamentos em genética e auxílio na realização deste trabalho.

Ao Doutor Bonald C. Figueiredo, pelos ensinamentos em biologia molecular e colaboração neste estudo.

Ao Professor Raul Ribeiro pelo intercâmbio com o St. Jude Children's Research Hospital e financiamento da análise genética realizada neste trabalho.

Ao Professor Izrail Cat, pelo espírito científico e ensinamentos em pediatria.

Aos professores do Departamento de Pediatria pela contribuição na formação profissional.

À Professora Martha Garcia Sanchez, pelos ensinamento em Metodologia Científica, apoio constante aos mestrandos e bom humor.

Às secretárias do Departamento de Pediatria, pela colaboração e eficiente trabalho.

À Antônia Schwinden, pela revisão do texto e à Maria Laura Zocolotti pela editoração do trabalho.

Aos colegas de mestrado, pelo companheirismo e estímulo.

Ao Edson Michalkiewicz, pela seu auxílio no intercâmbio com o o St. Jude Children's Research Hospital.

Aos amigos e colegas da Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Adriana, Bonald, Carla, Chica, Gabriela, Jandira, Márcia, Margareth, Marise, Rosana, Suzy, Tonelli; às secretárias Anita, Neuza e Verinha; que junto com os professores Dr. Romolo e e Dr. Lacerda tornaram esta casa um agradável local de trabalho e estudo.

A Raffaella e Paulo, Vilson Filho e Adriana pelo carinho e apoio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Às crianças e suas famílias.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
CONTEXTO	1
JUSTIFICATIVA	2
1 OBJETIVOS	3
1.1 GERAIS	3
1.2 ESPECÍFICOS	3
2 HIPÓTESES	4
3 FATORES DE LIMITAÇÕES	5
4 REVISÃO DE LITERATURA	6
4.1 INCIDÊNCIA DE TUMOR DE SUPRA-RENAL NA INFÂNCIA.....	6
4.1.1 Incidência	6
4.1.2 Idade.....	7
4.1.3 Sexo	8
4.2 AÇÃO DA PROTEÍNA P53	8
4.2.1 Características	8
4.2.2 Ações	9
4.3 MUTAÇÕES DO GENE TP53.....	11
4.4 PATOLOGIA DO TUMOR ADRENOCORTICAL	12
4.5 SÍNDROME DE LI-FRAUMENI.....	14
5 CASUÍSTICA E METODOLOGIA	18
5.1 METODOLOGIA CIENTÍFICA	18
5.2 AMOSTRA DE ESTUDO.....	18

5.3 METODOLOGIA DO TRABALHO	18
5.3.1 Características do Estudo.....	18
5.3.2 História Familiar.....	19
5.3.3 Índice Relativo de Grau de Parentesco Genético.....	19
5.3.4 Estudo de Mutações no P53	20
5.3.5 Métodos Estatísticos.....	22
6 RESULTADOS.....	23
6.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	23
6.2 HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCERES E GRAU DE PARENTESCO GENÉTICO	24
6.3 ANÁLISE DO GENE DA PROTEÍNA P53 EM LINFÓCITOS DE PACIENTES	27
7 DISCUSSÃO.....	30
7.1 IDADE E SEXO.....	30
7.2 RELAÇÃO COM CÂNCERES FAMILIARES.....	31
7.3 ANÁLISE GERMINATIVA DO GENE TP53	34
7.3.1 Mutações no Exon 10	34
7.3.2 Mutações no Codon 337	35
7.3.3 Substituição CGC por CAC	36
7.3.4 Mutação e Fatores Ambientais.....	36
CONCLUSÃO	39
ANEXOS.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE TABELAS

1	NÚMERO DO PROTOCOLO DOS PACIENTES AVALIADOS EM RELAÇÃO À HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER EM DUAS OU MAIS GERAÇÕES, E ÍNDICE RELATIVO DE GRAU DE PARENTESCO GENÉTICO.....	26
2	NÚMERO DO PROTOCOLO DOS PACIENTES QUE TIVERAM O SEQUENCIAMENTO DO GENE TP53, SEU REGISTRO NO HOSPITAL, EXONS ESTUDADOS E RESULTADOS	27
3	RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 2 A 11 DO GENE DA PROTEÍNA P53 EM AMOSTRA DE SANGUE PERIFÉRICO DE PARENTES DE PACIENTES	28
4	INICIAIS DOS PACIENTES PROVENIENTES DO NO ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL SUBMETIDOS AO SEQUENCIAMENTO DOS EXON 5 A 9 OU 5 A 10, DO GENE TP53 A PARTIR DE LINFÓCITOS E RESPECTIVAS MUTAÇÕES OBSERVADAS	29
5	APLICAÇÃO DE ÍNDICE RELATIVO DE GRAU DE PARENTESCO GENÉTICO. NAS FAMÍLIAS RELATADAS NA LITERATURA COMO PORTADORAS DE SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E COM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER EM 2 OU MAIS GERAÇÕES	33

LISTA DE FIGURAS

1	DESENHO ESQUEMÁTICO DO CICLO DE DIVISÃO CELULAR E MOMENTOS DA FASE DO CICLO EM QUE PODEM OCORRER AÇÃO DA PROTEÍNA P53	10
2	INCIDÊNCIA DE TUMORES EM FAMÍLIAS COM SÍNDROME DE LI-FRAUMENI (FIGURA MODIFICADA DE MALKIN ET AL., 1990).....	14
3	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM HEREDOGRAMA PARA EXEMPLIFICAR A ESTIMATIVA DO GRAU DE PARENTESCO GENÉTICO	20
4	DISTRIBUIÇÃO DE TUMORES DE ACORDO COM O SEXO DOS PACIENTES.....	23
5	DISTRIBUIÇÃO DOS TUMORES ADRENOCORTICAIS CONFORME IDADE E O SEXO DOS PACIENTES.....	24

RESUMO

O tumor de córtex de supra-renal é raro em crianças. Contudo, sua incidência está aumentada na Região Sul do Brasil e no Estado de São Paulo. O tumor adrenocortical é freqüentemente associado ao síndrome de Li-Fraumeni. Foram avaliados 51 pacientes com diagnóstico de tumor de córtex adrenocortical. Obteve-se a história de câncer em familiares de 48 pacientes, provenientes de 46 famílias. Utilizou-se o índice relativo de grau de parentesco genético para avaliar a probabilidade de transmissão de um gene comum associado com cânceres familiares. Foi realizado o seqüenciamento do gene TP53 a partir de sangue total em 31 pacientes e 12 familiares. A mediana de idade dos pacientes foi de 2,3 anos; a relação sexo feminino:masculino de 3,3:1. Das 46 famílias estudadas, 8 não apresentaram história familiar de presença de câncer, 24 apresentavam casos esporádicos de câncer (índice relativo de grau de parentesco genético entre 0,12 e 1,1) e 14 famílias com freqüência aumentada de câncer (índice maior que 1,1), porém nenhuma delas preenche os critérios para o diagnóstico de síndrome de Li-Fraumeni ou "*Li-Fraumeni-like*". Em 2 pacientes foram estudados os exons 5 a 9 e em 29 pacientes os exons 2 a 11. O seqüenciamento do gene apresentou mutação no exon 10, codon 337, base 1010, com substituição de arginina (CGC) por histidina (CAC) em todas as amostras cujo exon 10 foi avaliado. As mães de 6 pacientes apresentaram a mesma mutação; sendo que em 2 famílias as mães apresentavam a mutação e os pais eram normais; em outra família, a amostra da mãe era mutada e a dos três irmãos do paciente eram normais; 1 mãe apresentou o seqüenciamento do gene TP53 normal. Treze amostras de pacientes de um centro norte-americano foram utilizados como comparação; destes, 3 apresentaram mutação nos exons 6, codons 196, 213 e 219, e um no exon 7, codon 248; 9 mostraram seqüenciamento normal. Concluiu-se que a presença de tumores adrenocorticais na infância, em nossa região, não está associada à presença de cânceres em familiares, contudo está relacionada à mutação germinativa do p53, no exon 10, codon 337 com substituição de arginina por histidina.

SUMMARY

An adrenocortical tumor occurs rarely in children. The actual incidence of this tumor is unknown but it is estimated to be 0.3 cases per million per year in children under 16 years. The incidence of childhood adrenocortical tumors (ACT) is relatively higher in southern Brazil. This high incidence seems to be restricted to only two Brazilian states: Sao Paulo and Parana. An unexpected high incidence of this tumor is also noted among individuals carrying germline p53 mutations (Li-Fraumeni Familial Cancer Syndrome). Detailed family cancer histories were obtained in 46 families of 48 Brazilian patients with ACT. None of these families had history of cancer similar to that of the Li-Fraumeni Syndrome. The probability of the transmission of a common gene associated with cancer was estimated by the method of genetic relative index. Of 46 families, eight did not have history of cancer (index: zero), 24 had sporadic cases of cancer (index: 0.12-1.1) and 14 families had an apparent increased incidence of cancer (index: >1.1). Sequence analysis of the p53 gene, exons 2 to 11, was performed in 29 patients. Additional 2 patients had this analysis limited to exons 5 to 9. DNA sequencing in all patients, for whom the exon 10 was analyzed, showed a specific mutation in codon 337, with a substitution of arginine by histidine. No patient had mutations in exons 5 through 9 that are typically mutate in the Li-Fraumeni Syndrome. The mothers of six patients were also positive for the mutation; one mother had normal p53 sequencing. In three diverse families, in which the mothers were positive for the p53 mutation, two fathers and three siblings of a same family did not have this genetic abnormality. For comparison, of 13 patients admitted to St. Jude Children Research Hospital in Memphis, three had mutations in the p53 gene exons 6 and one in exon 7. Nine patients had normal p53 sequences. Four of these latter patients had extended p53 analysis that included the exon 10 and in all of them, there were no abnormalities. In conclusion, family members of children with ACT from southern Brazil do not present the spectrum of cancer seen in the Li-Fraumeni Syndrome. Moreover, they do not exhibit the p53 mutations usually associated with the Li-Fraumeni Syndrome. However, it appears that a specific mutation in the exon 10 of the p53 gene is associated with ACT in these children.

CONTEXTO

A incidência de tumor de supra-renal em indivíduos menores de 15 anos de idade é de aproximadamente 0,3 casos por milhão de habitantes/ano. A Região Sul do Brasil é exceção com uma incidência 11 a 12 vezes maior, aproximadamente de 3,4 a 4,2 novos casos por milhão de habitantes/ano.

A etiologia deste tipo de tumor é ainda desconhecida, porém, sabe-se que nos indivíduos com o síndrome de Li-Fraumeni, caracterizada pela presença de tumores em familiares e alterações no gene da proteína p53, a incidência do adenocarcinoma de supra-renal é de 1%.

JUSTIFICATIVA

O maior número de casos diagnosticados na Região Sul do Brasil, quando comparado com outras regiões estudadas, sugere a existência de um fator ambiental. (MARIGO et al., 1969; MILLER, 1989; RIBEIRO et al. 1990; STILLER et al., 1996; SANDRINI et al., 1997).

O adenocarcinoma de supra-renal na infância está frequentemente relacionado com o síndrome de Li-Fraumeni.

Apesar de alta incidência deste tumor em pacientes atendidos na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná (UFPR), não houve relato de histórias compatíveis com a presença de cânceres familiares, sugerindo que estes tumores devem ter outra etiologia que não a da síndrome de Li-Fraumeni. (SANDRINI et al. 1997).

A avaliação do gene TP53, considerado o codificador de uma proteína protetora contra câncer e que está mutado neste síndrome, pode reforçar a hipótese de que a etiologia de adenocarcinoma de supra-renal na Região Sul do Brasil é outra que não a do síndrome de Li-Fraumeni.

1 OBJETIVOS

1.1 GERAIS

Estudar a incidência de cânceres em familiares, bem como as alterações do gene da proteína p53 em crianças com tumores adrenocorticais atendidas na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Departamento de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

1.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de câncer em familiares de crianças com tumor adrenocortical.
- Identificar a presença de alterações do gene da proteína p53 no sangue periférico dos pacientes pediátricos com tumor de supra-renal atendidos na UFPR e em familiares diretos de alguns pacientes.

2 HIPÓTESES

- A presença de tumor adrenocortical estaria relacionada com a presença aumentada de outros tipos de tumores nas famílias;
- A etiologia dos tumores adrenocorticais em pacientes atendidos na UFPR depende da integridade do gene TP53.

3 FATORES DE LIMITAÇÕES

Os dados de história familiar foram obtidos a partir de um questionário respondido pelos pais e/ou outros familiares.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 INCIDÊNCIA DE TUMOR DE SUPRA-RENAL NA INFÂNCIA

4.1.1 Incidência

Estima-se que a incidência de tumor adrenocortical em pacientes com idade inferior a 15 anos nos Estados Unidos é de 0,2-0,3 casos anuais por 1.000.000 de habitantes. (YOUNG et al., 1986).

Na região de Manchester, noroeste da Inglaterra, a incidência de doença maligna em criança é de 100/milhão de habitantes com menos de 15 anos/ano. A incidência de carcinoma adrenocortical nesta população é de 0,33 casos/milhão de crianças/ano. (BIRCH et al. 1980; HARTLEY et al. 1987).

Entre os anos de 1971 e 1980, foram registrados 234 carcinomas, o que equivale a 2% de todos os cânceres na infância. Vinte e cinco dos carcinomas eram adrenocorticais, significando uma incidência de 2,5 carcinomas adrenocorticais/ano para toda a Inglaterra, com uma população aproximada de 48 milhões de habitantes. (McWHIRTER et al. 1989).

Em 1969, Marigo et al. observaram no hospital Santa Casa de São Paulo 19 casos de carcinoma adrenocorticais em 1.127 cânceres registrados em pacientes com idade inferior a 15 anos. Corresponde a 2,9% dos tumores sólidos na infância. (MARIGO et al., 1969).

No Sul do Brasil e no Estado de São Paulo a incidência dos tumores adrenocorticais em crianças varia de 3,4 a 4,4 casos novos ao ano por 1.000.000 de habitantes com idades inferiores a 15 anos. (RIBEIRO et al., 1990; EPELMAN et al., 1991; SANDRINI et al., 1997).

4.1.2 Idade

Mcwhirter et al. (1989), na Grã-Bretanha, observaram que 68% dos cânceres adrenocorticais em crianças com menos de 15 anos ocorriam em idade inferior a 5 anos.

Bergadá et al. (1996), na Argentina, avaliando crianças com idade inferior a 16 anos, relataram que 50% dos cânceres de córtex de supra-renal ocorreram em crianças com idade inferior a 5 anos.

Mayer et al. (1997), no hospital Sainte-Justine de Montreal, Canadá, registraram que a mediana da idade de seus pacientes pediátricos com tumores adrenocorticais foi de 7 anos, e de 11 pacientes estudados, somente 4 tinham idade inferior a 4 anos.

Mendonça et al. (1995) acompanharam 38 pacientes diagnosticados com tumor adrenocortical no Hospital de Clínicas de São Paulo, entre os anos de 1980 e 1992. Deste grupo, 18 (47%) possuíam menos de 15 anos ao diagnóstico.

O Grupo de Estudo de Registro de Carcinomas Adrenocorticais da Itália analisou a incidência menor de câncer nos pacientes pediátricos. Apenas 4 dos 129 carcinomas adrenocorticais foram encontrados em pacientes com idade inferior a 10 anos.(CRUCITTI et al., 1996)

A incidência total de carcinoma adrenocortical em todas as idades na Noruega é de 1,5 por milhão de habitantes por ano. Em 15 anos foram registrados 99 casos, sendo que somente 4 destes foram em pacientes com idade inferior a 20 anos. (SØREIDE et al., 1992).

Quarenta e dois dos 58 casos (72,4%) diagnosticados em crianças com menos de 16 anos, observados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de 1966 a 1992, eram em crianças com idade inferior a 4 anos.(SANDRINI et al. 1997).

4.1.3 Sexo

Mayer et al.(1997), Montreal, Canadá, em estudo com crianças com menos de 13 anos, examinaram 11 casos em 24 anos, sendo que 3 eram do sexo masculino e 8 do feminino. Com idade inferior a 5 anos, a relação feminino:masculino foi de 1:1.

Soreide et al. (1992), Noruega, observaram 3 casos do sexo masculino e 1 do feminino em pacientes em idade inferior a 20 anos; 2 casos do sexo masculino foram identificados em pacientes com idade inferior a 10 anos.

Bergadá et al. (1996), Argentina, registraram uma relação de 3 casos do sexo feminino, para 1 do masculino de tumor adrenocortical na infância. Em idade inferior a 5 anos, esta relação foi de 7:3.

Hartley et al. (1987), Manchester, identificaram uma relação de tumores adrenocorticais de 7 casos femininos para 1 caso masculino. E apenas pacientes do sexo feminino em idade inferior a 5 anos.

Sandrini et al. (1997), Curitiba, demonstraram predomínio de casos no sexo feminino em pacientes com idade até 4 anos, com uma relação de 5,3 casos para 1 caso do sexo masculino. Em idade superior a 4 anos não houve predomínio relacionado ao sexo do paciente.

4.2 AÇÃO DA PROTEÍNA P53

4.2.1 Características

No braço curto do cromossomo 17 (17p), está localizado o gene da proteína p53. (LEVINE et al., 1991; LEWIN, 1997).

O gene da proteína p53, no ser humano, possui 11 exons e codifica uma proteína de 393 aminoácidos. (SOUSSI et al. 1996).

O gene da proteína p53 é formada por três partes:

- Região Amino-terminal: responsável pela ligação reversível com proteínas. Esta região possui a área de transativação transcripcional do gene.
- Região Central: importante por ser a região que contém 4 das 5 regiões conservadas da proteína; é o local onde ocorre o maior número de mutações.
- Região Carboxi-terminal: com funções de localização celular, tetramerização (conformação da proteína) (STRÜRZBECHER et al., 1992) e reconhecimento da lesão primária do DNA (SOUSSI et al., 1996).

O seqüenciamento de gene TP53 em anfíbios, mamíferos, peixes e pássaros revela que neles há regiões semelhantes às encontradas no homem, denominadas de regiões conservadas. Este dado sugere que nestas áreas estão codificadas as funções da proteína p53. (HOLLSTEIN et al., 1991; FROMENTEL et al., 1992; SOUSSI et al., 1996).

4.2.2 Ações

Admite-se que a maioria dos cânceres resulta de uma série de alterações genéticas que interrompem os complexos mecanismos de controle do crescimento celular. (GIQUEL et al., 1995).

Há quase uma década, sabe-se que alterações no gene que codifica a proteína p53 podem favorecer o surgimento de carcinomas. (NIGRO et al., 1989)

A proteína p53 impede a progressão do ciclo celular em células com DNA alterado. (KASTAN et al., 1991).

A atividade da proteína p53 depende da fase do ciclo em que a célula se encontra:

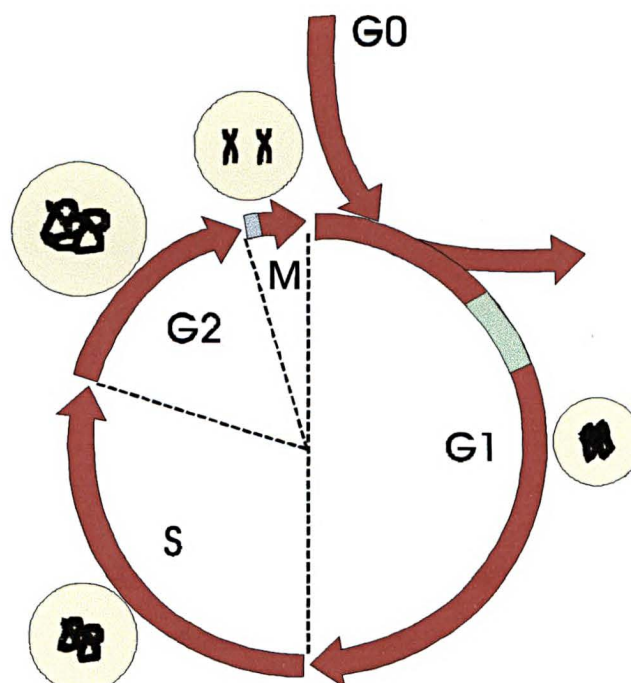


FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO CICLO CELULAR E MOMENTOS DA FASE DO CICLO EM QUE PODEM OCORRER AÇÃO DA PROTEÍNA P53

Fase G0=período fora do ciclo celular

Fase G1= proliferação de RNA

Fase S= replicação do DNA

Fase G2= proliferação de RNA

Fase M= divisão mitótica

Área verde = período do ciclo celular que ocorre ação da proteína p53 e promove reparo no DNA.

Área azul = período do ciclo celular em que a proteína p53 induz a apoptose.

- 1) Se houver alterações no DNA no início da fase G1 [(Área verde da figura 1) onde ocorre proliferação de RNA, e ainda não ocorreu duplicação do DNA], então a proteína p53 pode ativar a correção com indução da proteína p21 [um inibidor da cdk (*cyclin dependent kinase*)], e impedir a progressão do ciclo celular para a fase S (replicação do DNA). Isto permite o reparo do DNA alterado antes de seguir com a divisão celular. (LEWIN, 1997; SOUSSI et al., 1996).
- 2) Se a célula já iniciou a fase de replicação do DNA, a proteína p53 induz à morte celular (apoptose). (WANG, 1995; LEWIN, 1997) (Área azul da figura 1).

4.3 MUTAÇÕES DO GENE TP53

Alterações do gene TP53 são as causas gênicas mais comuns de carcinomas no homem. (GREENBLAT et al., 1994).

As mutações somáticas são responsáveis por 98% das mutações observadas em tumores. (HOLLSTEIN et al., 1991).

Mutações somáticas do p53 ocorrem em 40 a 45% dos pacientes com câncer. (SOUSSI et al., 1994).

Aproximadamente metade dos pacientes com tumores e mutações germinativas do gene da proteína p53 apresenta características do síndrome de Li-Fraumeni. (KLEIHUES et al., 1997).

Shaulsky et al. (1991) inferiram que as mutações no gene TP53 de alguns tecidos, com a perda do mecanismo de supressão, não seriam suficientes para que se desenvolva o tumor, mas que as mutações poderiam exercer algum tipo de indução à divisão celular de característica maligna.

De todas as mutações observadas (somáticas e germinativas), 89% ocorrem nas regiões entre os exons 5-8. (GREENBLAT et al., 1994).

Apesar de não ser região de “*hot spot*”, Lin et al. (1994), estudando tecido de tumores adrenocorticais, sugeriram a inclusão do exon 4 como local de mutações freqüentes do gene TP53. Estes achados, em tecido de tumores adrenocorticais, não foram observados por Reincke et al (1996).

Casey et al. (1996), avaliando tecidos tumorais de mama, ovário e pulmão, relataram que aproximadamente 20% das mutações ocorreram em regiões fora dos exons 5 a 9 e concluíram que o predomínio de mutações observadas nas áreas denominadas de “*hot spot*” é decorrente de poucos estudos realizados em outros exons.

A mutação de ponto é responsável por 95% das mutações observadas no gene de proteína p53. (SOUSSI et al., 1996).

Agentes mutagênicos específicos de um ambiente poderiam provocar mutações em regiões específicas do gene. (CHIN et al., 1994).

As mutações do gene TP53 estão catalogadas em bancos de dados disponíveis na rede internacional de computadores, INTERNET (SEDLACEK(2),1998; CARIELLO, 1994).

4.4 PATOLOGIA DO TUMOR ADRENOCORTICAL

O tumor adrenocortical na infância é raro. (GICQUEL,1997) A evolução para a cura após a cirurgia é de aproximadamente 50% (SANDRINI et al., 1997). Os critérios histopatológicos não diferenciam com precisão os tumores de natureza benigna daqueles de natureza maligna. (HOLCOMBE et al., 1984; LACK et al., 1992; CASTRO et al., 1993; FEDERICI et al., 1994; GICQUEL et al., 1995; BERGADÁ et al., 1996; ABRAMSON et al., 1997; MAYER et al., 1997; LACK et al., 1997; SANDRINI et al., 1997).

O estudo de conteúdo de DNA de células de tumores adrenocorticais, por meio de citofluxometria, mostrou existir correlação entre aneuploidia das células e características histológicas de carcinoma, porém não houve correlação entre os achados e o comportamento dos tumores estudados. (CIBAS et al., 1990; BUGG et al., 1994).

O prognóstico da doença parece depender mais do volume do tumor, presença de metástases e da ressecção completa do tumor que dos parâmetros histopatológicos. (ZOGRAFOS et al., 1994; GICQUEL et al., 1997(1); SANDRINI et al., 1997).

Bergadá et al. (1996) correlacionaram o prognóstico de evolução benigna, pós-cirurgia, em pacientes pediátricos, com peso de tumor inferior a 100 gramas.

Michalkiewicz et al. (1997) demonstram a evolução favorável nos pacientes pediátricos com tumores menores que 200 cm³ ou peso inferior a 100 gramas.

Na população adulta, o prognóstico da doença está relacionado principalmente com a presença ou não de metástases. (EVANS et al., 1996; BARZON et al., 1997).

Barzilay et al. (1989) associaram a cura, em adultos e crianças, ao diagnóstico precoce do tumor adrenocortical.

A forma mais comum de apresentação de tumores adrenocorticais é a esporádica, podendo, no entanto, haver associação com síndromes, como o de Li-Fraumeni (mutações no gene da proteína p53), o de McCune-Albright (alterações na proteína G), o de Beckwith Wiedemann (relacionada a mutações no cromossomo 11), e com a hemi-hipertrofia (TANK et al., 1980; HENRY et al., 1989(2); LACK et al., 1992; FEDERICI et al., 1994; GICQUEL et al., 1995). Jaresch et al. (1992) sugeriram que tumores adrenocorticais, principalmente adenomas, estariam relacionados à hiperplasia congênita de supra-renal; porém Beuschlein et al. (1998) inferiram que não há relação entre deficiência de 21-hidroxilase e tumores adrenocorticais.

A análise imuno-histoquímica das células tumorais sugere que a concentração elevada da proteína p53 no núcleo celular esteja relacionada com comportamento mais agressivo do tumor (VARGAS et al., 1997; EDGREN et al., 1997), assim como a mutação do gene TP53 no tecido tumoral. (FOGT et al., 1998).

A patogênese dos tumores de supra-renal ainda não está totalmente esclarecida.

Adenomas e carcinomas adrenocorticais podem ser estádios diferentes de um mesmo processo (OHGAKI et al., 1993; GICQUEL et al., 1995; McNICOL et al., 1997). Alterações de outros genes, como o do IGF-II, poderiam induzir a transformação de benigno para maligno. (GICQUEL et al., 1997 (2)).

Reincke et al. (1994), estudando uma população adulta, identificaram baixa incidência de mutação somática do gene TP53 em adenomas quando comparados com carcinomas adrenocorticais e sugeriram que os mecanismos tumorigênicos dos adenomas são diferentes dos carcinomas.

Hartley et al. (1987) encontraram história familiar sugestiva de Síndrome de Li-Fraumeni em 28% dos pacientes com tumores adrenocorticais na infância.

Wagner et al. (1994) observaram que metade das crianças com tumores adrenocorticais apresentava mutações germinativas no gene TP53.

Kleihues et al. (1997) avaliaram pacientes com mutações germinativas do p53 e apontaram que 3,6% apresentavam tumor adrenocortical e que a média de idade destes pacientes era de 4,9 anos.

Exposição a agentes químicos como solventes e agrotóxicos tem sido relatada frequentemente em pais ou pacientes com tumores adrenocorticais (HARTLEY et al., 1987; SANDRINI et al., 1997).

Alguns trabalhos sugerem que a indução de proto-oncogenes, como o KRAS, poderia ser responsável por tumores adrenocorticais em ratos suscetíveis (KIMURA et al., 1988). Porém, estudos em tumores adrenocorticais esporádicos no homem apresentaram resultados variáveis no que diz respeito a mutações no gene *ras* e seu envolvimento na gênese tumoral. (OHGAKI et al., 1993; LIN et al., 1998).

4.5 SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

O síndrome de Li-Fraumeni, uma forma rara de câncer familiar, apresenta herança autossômica dominante. Indivíduos heterozigotos afetados apresentam mutação no gene TP53 e cânceres em diversos tecidos. (LEWIN et al., 1997).

Descrito inicialmente por Li e Fraumeni, em 1969, o síndrome caracteriza-se pela presença de sarcomas de tecidos moles, câncer de mama e outras neoplasias em indivíduos jovens da mesma família. (LI et al., 1969).

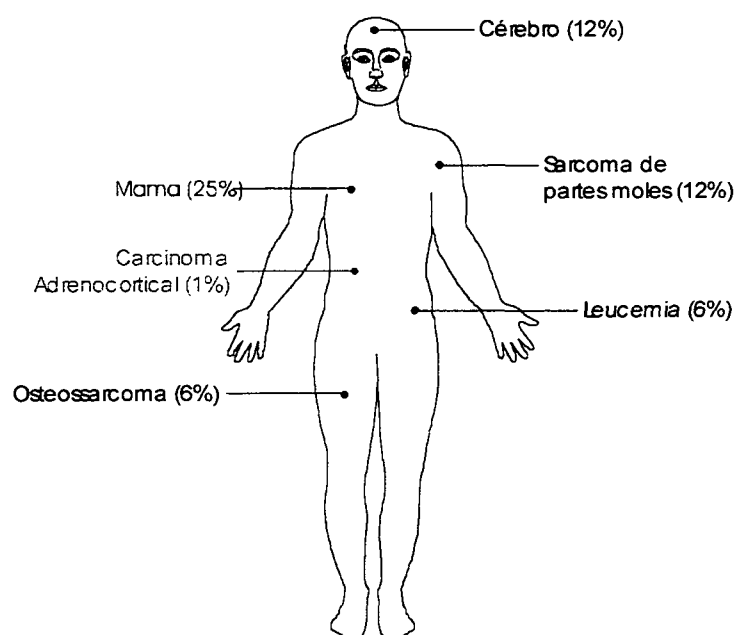


FIGURA 2 - INCIDÊNCIA DE TUMORES EM FAMÍLIAS COM SÍNDROME DE LI-FRAUMENI (FIGURA MODIFICADA DE MALKIN ET AL., 1990)

Os critérios para a caracterização do síndrome são:

- 1) indivíduo com sarcoma em idade inferior a 45 anos;
- 2) câncer em parente de primeiro grau em idade inferior a 45 anos e
- 3) outro parente de primeiro ou segundo grau com diagnóstico de qualquer câncer antes de 45 anos ou de sarcoma em qualquer idade (LI et al., 1988).

Em 1994, BIRCH et al. sugeriram a forma não clássica ou “*Li-Fraumeni Syndrome –like families*”, quando ocorrerem estes três achados:

- 1) probando com um câncer na infância, ou câncer de cérebro ou adrenocortical em idade inferior a 45 anos com
- 2) parente de primeiro ou segundo grau com câncer de mama ou adrenocortical ou de cérebro ou sarcoma em qualquer idade e
- 3) parente de mesma linhagem de primeiro ou segundo grau com câncer em qualquer idade.

A presença de dois tumores primários em crianças sugere uma patogênese semelhante à do síndrome (LEVINE et al., 1978; TOGUUCHIDA et al., 1992; TENOUTASSE et al., 1997).

A busca de tumores em familiares de crianças com tumores pode detectar o síndrome de Li-Fraumeni antes do surgimento de câncer nos pais. (LYNCH et al., 1985).

Parece que alguns fatores ambientais ou genéticos, associados à mutação germinativa do gene da proteína p53, promovem características clínicas diferentes entre as famílias com o síndrome de Li-Fraumeni. (HORIO et al., 1994)

Os processos carcinogênicos são multifatoriais e ocorrem em estádios. É possível que mutações ocorram e se acumulem durante gerações, aumentando os riscos carcinogênicos nos seus descendentes. (TOMATIS et al., 1992).

No início da década de 1990 foi reconhecido que as mutações no gene TP53 são responsáveis pela incidência aumentada de carcinomas nos indivíduos afetados em famílias com o síndrome de Li-Fraumeni. (MALKIN et al.(2),1990; SRIVASTAVA et al., 1990; SANTIBÁÑEZ-KOREF et al., 1991).

Esta mutação apresenta uma ação dominante sobre o alelo normal do gene. (LEWIN et al., 1997).

Parece existir uma competitividade de ação entre as proteínas originais e mutadas, com esta última apresentando-se em maior quantidade no interior das células e promovendo a suscetibilidade a tumores. (CHEN et al., 1990).

O estudo do tecido tumoral de pacientes de famílias com síndrome de Li-Fraumeni revela perda de heterozigotidade do alelo normal em menos da metade dos tumores, o que sugere a necessidade de outro mecanismo, além da perda de função da proteína p53. (VARLEY et al., 1997).

As alterações do p53 poderiam ser apenas um fator associado a outros para o desenvolvimento de tumores. (KUMAR et al., 1995; TENOUTASSE et al., 1997).

Nos pacientes relacionados a famílias com o síndrome de Li-Fraumeni, os tumores adrenocorticais apresentam perda de heterozigotidade em metade dos casos. Este dado sugere que apenas a mutação germinativa pode não ser suficiente para o desenvolvimento maligno dos tumores. Os riscos ambientais devem sempre ser considerados. (SCHATZKIN et al., 1995; VARLEY(2) et al., 1997).

Sedlacek(1) et al. (1998) sugerem que o alelo mutado do gene TP53 pode ser um fator de suscetibilidade a carcinomas, com aparente manutenção da função do alelo normal.

Algumas famílias com características de síndrome de Li-Fraumeni parecem possuir mecanismos que afetam de modo indireto as funções da proteína p53, pois o seqüenciamento do gene e as provas de função da proteína são normais. (BARNES et al., 1992).

Os pacientes com síndrome de Li-Fraumeni apresentam uma incidência de câncer de supra-renal de aproximadamente 1%. (MALKIN et al., 1990(1); LACK et al., 1997)

Em famílias que preenchem critérios para o síndrome de Li-Fraumeni e apresentam mutação germinativa do p53, a incidência de tumor adrenocortical é de 4%. (KLEIHUES et al., 1997).

Devido a esta incidência aumentada, a presença de tumor adrenocortical na infância é considerada como caso índice do síndrome de Li-Fraumeni. (TSUNEMATSU et al., 1991; SAMESHIMA et al., 1992; TSUKAMOTO et al., 1992; PRITCHARD-JONES et al., 1996; LECOINTRE et al., 1997).

Estima-se que 50% das famílias com o síndrome de Li-Fraumeni possuem alteração germinativa no gene da proteína p53.(SRIVASTAVA et al., 1990; BRUGIÈRES et al., 1993; BIRCH et al., 1994).

Varley et al.(1) (1997) sugerem que foi possível observar mutações germinativas no p53 em 71% das famílias com síndrome de Li-Fraumeni clássica e em 22% das famílias com “*Síndrome de Li-Fraumeni like*”.

A avaliação do gene TP53 de famílias com o síndrome de Li-Fraumeni revela que a presença de tumores adrenocorticais na infância nestas famílias está fortemente relacionada com mutações germinativas neste gene. (SAMESHIMA et al., 1992; BIRCH et al.; KLEIHEUS et al., 1997)

Ainda, alterações germinativas do gene TP53 são descritas em 50% dos tumores adrenocorticais esporádicos na população pediátrica em Toronto, Canadá. (WAGNER et al., 1994).

Na população com câncer de todos os tipos, a prevalência de mutações germinativas do gene TP53 é de aproximadamente 1%. (QUESNEL et al., 1997)

Os trabalhos citados na literatura reforçam a hipótese de que tumores de córtex adrenal na população pediátrica são sugestivos da presença do síndrome de Li-Fraumeni. (TSUKAMOTO et al., 1992; HARTLEY,1987).

No síndrome de Li-Fraumeni, quando comparado à população geral, há um maior risco de câncer principalmente em indivíduos com idade inferior a 19 anos. E isto é mais evidente quando observados os carcinomas adrenocorticais. (GARBER et al., 1991).

5 CASUÍSTICA E METODOLOGIA

5.1 METODOLOGIA CIENTÍFICA

O método utilizado foi o descritivo, modalidade “*survey*”.

5.2 AMOSTRA DE ESTUDO

Pacientes com diagnóstico de tumor adrenocortical atendidos na Unidade de Endocrinologia Pediátrica (UEP) do Departamento de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período compreendido entre janeiro de 1966 a junho de 1998.

Dos 89 pacientes pediátricos com tumor adrenocortical registrados na UEP, 51, que persistem em acompanhamento ambulatorial, foram incluídos no estudo.

Em 48 pacientes foi possível obter informações relacionadas à presença de câncer em mais de duas gerações.

Em duas famílias havia mais de um paciente incluído no estudo.

Foi estudado o seqüenciamento do gene TP53 a partir de amostra de sangue periférico de 31 pacientes.

5.3 METODOLOGIA DO TRABALHO

5.3.1 Características do Estudo

Foi realizado um estudo retrospectivo com utilização dos prontuários dos pacientes.

5.3.2 História Familiar

Dos protocolos de atendimento aos pacientes da UEP, foram obtidos os dados de história familiar de câncer. Aqueles prontuários que possuíam dados incompletos, eram refeitos a partir de nova entrevista com a família dos pacientes.

A partir dos dados obtidos, elaborou-se o heredograma para determinar o grau de parentesco genético entre o paciente com tumor adrenocortical e seus parentes relacionados.

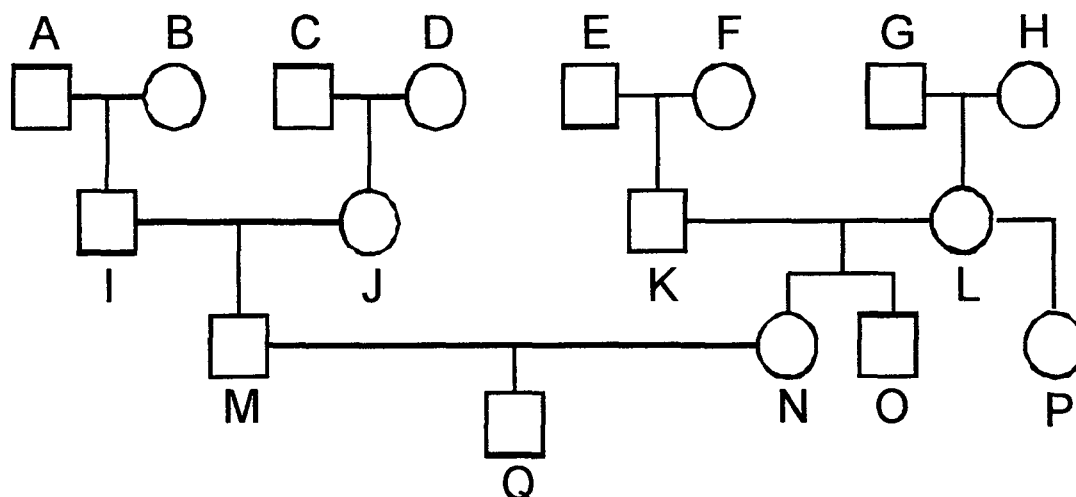
5.3.3 Índice Relativo de Grau de Parentesco Genético

Com os dados relativos à presença de câncer na família, foi montada a genealogia e determinado o grau de parentesco genético entre o probando e o paciente relacionado. Como em alguns casos existiam mais de um parente que apresentava câncer na genealogia e como as genealogias apresentavam número diferente de indivíduos, isto é, eram de tamanhos diferentes, optou-se por adotar um índice que refletisse tal situação, como já descrito por Sandrini (1993). O cálculo do índice foi feito da seguinte maneira: foram somados os valores relativos aos graus de parentesco observados entre o probando e as diferentes partes que apresentaram câncer (MALÈCOT, 1948), e este valor foi dividido pelo número total de indivíduos que compunham a genealogia. Denominou-se esta nova variável de “índice relativo de grau de parentesco genético” (IRGPG).

5.3.3.1 Grau de parentesco genético

A passagem dos genes de uma geração para outra geração seguinte, isto é, descendente, cria possibilidades de relações gênicas entre indivíduos que possuíam pelo menos um ancestral comum. Tais indivíduos são ditos “parentes genéticos” e geralmente são mais semelhantes fenotipicamente que quaisquer outros indivíduos da população. O grau de parentesco genético entre 2 indivíduos mede a magnitude desta relação, considerando a possibilidade de ambos receberem um mesmo gene presente

no ancestral comum, e corresponde ao dobro do coeficiente de endogamia de descendentes de um eventual cruzamento entre esses parentes.



Na genealogia representada, as estimativas seriam as seguintes:

- 1) entre M e Q \rightarrow (pai e filho) = 0,5;
- 2) entre I e Q \rightarrow (avô e neto) = 0,25;
- 3) entre O e Q \rightarrow (tio e sobrinho) = 0,25.
- 4) entre A e Q \rightarrow (bisavô e neto) = 0,125;
- 5) entre primos = 0,125
- 6) entre N e P \rightarrow (meio-irmãos) = 0,25

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM HEREDOGRAMA PARA EXEMPLIFICAR A ESTIMATIVA DO GRAU DE PARENTESCO GENÉTICO

Arbitrariamente, definimos que valores superiores a 1,1 desta variável, denominada “índice relativo de grau de parentesco genético”, foram considerados como provável correlação familiar de cânceres.

5.3.4 Estudo de Mutações no Gene TP53

Foi realizado o sequenciamento do gene da proteína p53 de sangue periférico de 31 pacientes com diagnóstico de tumor de supra-renal. As amostras de sangue foram coletadas com o consentimento dos pais ou responsáveis pelos pacientes.

Este material foi enviado ao Laboratório Oncormed, de Gaithersburg, Maryland, nos Estados Unidos, onde foi realizado o seqüenciamento do gene TP53.

Amostras de DNA de sangue total congelado a -20°C foram extraídas de acordo com o protocolo de um "kit" comercial (Qiagen, Inc. Valencia, CA, Cat.# 13343). A concentração de DNA foi quantificada por absorbância ultravioleta. O grau de purificação do DNA extraído foi excelente, considerando que a absorbância encontrada em todas as amostras, para um comprimento de onda de 260nm, foi acima de 1,5 vezes superior à da absorbância em 280nm. A presença de DNA de alto peso molecular foi confirmada por eletroforese em gel de Agarose a 1%.

Amostras consideradas adequadas foram amplificadas, pelo método convencional de PCR (Polymerase Chain Reaction), dos exons 2 ao 11 do gene TP53. Cada exon foi amplificado separadamente em reação de PCR utilizando tampão padrão PE 10X PCR, 25mM de MgCl₂, 2mM de cada DNTP e "Taq Gold" (5U/gi) (PE-ABI, Foster City, CA).

Os "primers", preparados a partir do vetor M13, foram adicionados e locados nos introns, compreendendo 10 a 20 bases dos introns, de tal forma que cada exon pôde ser seqüenciado completamente. Foi utilizado para amplificação um termo-ciclador Perkin Elmer 9600. O produto da amplificação foi visualizado após eletroforese em gel de Agarose a 2%. Os tamanhos das bandas encontradas variaram de 100 a 300 pares de bases e estão de acordo com o esperado.

Utilizaram-se reagentes comercializados, para os diversos procedimentos. Os produtos do PCR foram purificados pela utilização de um bloco de purificação de PCR em placas com 96 poços (Qiagen, Inc. Valencia, CA, Cat.# 28180) em um sistema a vácuo (Mainfold de Perkin Elmer 9600). As amostras foram secadas e novamente suspensas em 20µl de água. Este material foi marcado com um "kit" de marcação com substância fluorescente (FS dye terminator chemistry, PE-ABI, Foster City, CA, Cat.# 402154). As reações novamente ocorreram no termo-ciclador Perkin Elmer 9600. O material resultante das reações de fixação de marcadores fluorescentes foi purificado

utilizando-se um bloco de 96 poços. (Edge Biosystems, Inc., Gaithersburg, MD, Cat.# 4050110). Foramida e corante foram adicionados ao DNA amplificado por PCR e colocado para secar, e depois introduzidos no seqüenciador fluorescente de DNA automatizado ABI 377 (Perkin-Elmer Foster City, CA).

Os dados foram coletados e analisados utilizando os programas de dados e coleções do ABI 377. Os arquivos foram alinhados e comparados com seqüência padrão (Genebank Accession XO2469). Os picos de fluorescência foram revisados por um leitor, a fim de detectar mutações que poderiam não ser detectadas pelo programa base. Cada exon foi seqüenciado em ambas as direções, direta e reversa (3'-5' e 5'-3'), e todas as mutações foram confirmadas numa segunda análise da amostra.

5.3.5 Métodos Estatísticos

Recorreu-se à análise descritiva dos dados por meio de quadros, tabelas e gráficos.

Para a comparação dos dados, foram utilizados os testes “Comparação entre Duas Proporções” (pelo software “*Primer of Biostatistics*”) e “Qui-Quadrado com correção de Yates” (por meio do “*Epi-Info*”), para amostras independentes.

O nível de significância (ou probabilidade de significância) mínimo adotado foi de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Os dados de identificação dos 89 pacientes registrados na UEP encontram-se no Anexo 1 e 2. Destes, 5 pacientes foram submetidos à cirurgia em outro serviço.

Desta amostra, foi possível incluir no estudo 51 pacientes. Doze (23,5%) pacientes são do sexo masculino e 39 (76,5%) do feminino (figura 4).

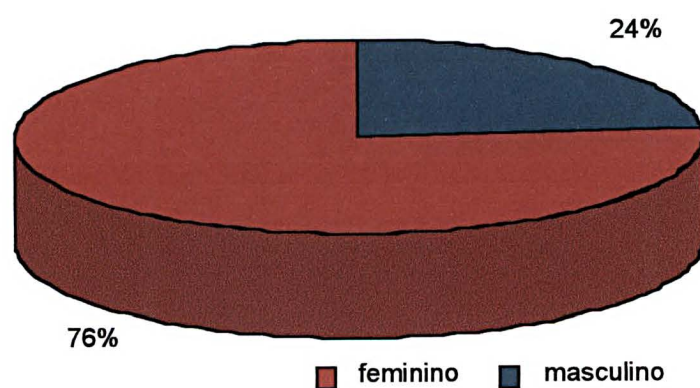


FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE TUMORES DE ACORDO COM O SEXO DOS PACIENTES

A média de idade foi de 3,38 anos \pm 3,17 e mediana de 2,33 anos, variando de 4 meses a de 13,4 anos; 42 (82,3%) casos ocorreram em idade inferior a 5 anos (figura 5).

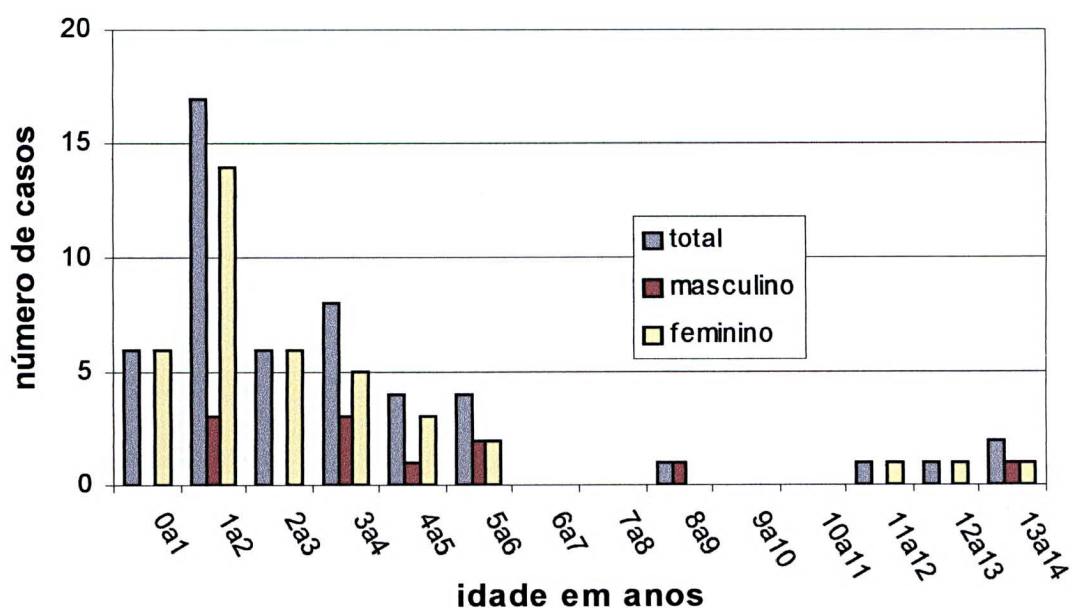


FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS TUMORES ADRENOCORTICAIS CONFORME IDADE E O SEXO DOS PACIENTES

A média de idade dos pacientes do sexo feminino foi de $3,0 \pm 3,0$ anos (mediana de 1,9 anos) e a do sexo masculino, de $4,67 \pm 3,3$ anos (mediana de 3,64).

A relação feminino : masculino de tumores na amostra total foi de 3,3:1. Porém, quando analisada em idade inferior a 5 anos, esta relação foi de 4,86 : 1; após os 5 anos, a incidência é praticamente semelhante entre os sexos, 1,25 : 1.

6.2 HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCERES E GRAU DE PARENTESCO GENÉTICO

Foi possível obter a história familiar de câncer em 48 pacientes, ou 46 famílias. O número de famílias estudadas e o respectivo número de gerações foram:

- em 1 família, 5 gerações;
- em 36 famílias, 4 gerações;
- em 8 famílias 3 gerações;
- em 1 família, 2 gerações, e
- em 3 famílias não foi possível obter dados familiares confiáveis.

Em 8 famílias não havia história de outros cânceres. Cânceres esporádicos foram observados em 24 famílias (índice ponderado da somatória com valores compreendidos entre zero e inferior a 1,1). Nas demais famílias, apesar de uma alta frequência de tumores, não havia padrão sugestivo de síndrome de Li-Fraumeni. (tabela 1).

Há uma maior proporção de casos de câncer na família de pacientes com idade inferior a 5 anos (1,3 casos por probando) comparados com aqueles com idade superior a 5 anos (0,3 casos por probando). ($p < 0,0001$). Não foi observada diferença de proporção relacionada ao sexo do probando.

Nas famílias dos pacientes 64, 67, 80, 86, 87 e 88 há relato ou história sugestivas de tumores adrenocorticais em mais de um membro da família.

O paciente 64 é prima da mãe da paciente 80. E em ambos o diagnóstico foi feito aos 9 meses de idade. Há, ainda, relato com confirmação diagnóstica de tumor de supra-renal em um terceiro membro da família que ocorreu aos 2 anos, além de história de óbito associado a obesidade e pilificação pubiana aos 5 anos em outros 2 membros. Nesta mesma família havia história de óbito, do bisavô, por um tumor abdominal aos 50 anos e por tumor de sistema nervoso central em outras duas crianças. (ver Anexo 3).

Em outra família há diagnóstico de tumor adrenocortical em duas meia-irmãs (pacientes 87 e 88), filhas de mesma mãe, com diagnóstico comprovado com 1 e 5 anos de idade.

Em uma terceira família há casos comprovados de tumores adrenocorticais no paciente 86 e um meio-irmão, filhos de mesma mãe, diagnosticados aos 7 e 11 anos, e história referida deste tumor em um avô (pai da mãe de ambos pacientes).

Na família da paciente 67 há confirmação em uma prima de tumor adrenocortical diagnosticado aos 2 anos de idade.

TABELA 1 - NÚMERO DO PROTOCOLO DOS PACIENTES AVALIADOS EM RELAÇÃO À HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER EM DUAS OU MAIS GERAÇÕES, E ÍNDICE RELATIVO DE GRAU DE PARENTESCO GENÉTICO

PACIENTE	NÚMERO DE GERAÇÕES ESTUDADAS	NÚMERO DE FAMILIARES ESTUDADOS	CASOS DE CÂNCER	Σ	% Σ
03	3	33	1	0,25	0,757
19	4	80	0	0	0
24	4	29	1	0,25	0,86
26	4	84	0	0	0
28	4	47	1	0,125	0,265
30	4	134	2	0,375	0,28
31	4	22	1	0,0625	0,28
33	4	119	2	0,5	0,42
35	3	47	1	0,25	0,53
38	4	55	2	0,375	0,68
41	4	56	2	0,375	0,67
42	3	14	1	0,5	3,5
43	4	60	4	0,75	1,25
44	4	48	5	0,5625	1,56
45	4	34	0	0	0
47	4	88	0	0	0
48	4	33	0	0	0
49	4	107	8	1,125	1,05
50	4	41	5	0,875	2,1
51	2	38	1	0,125	0,33
52	4	41	1	0,5	1,21
53	4	55	2	0,25	0,45
54	4	64	5	0,75	1,17
56	5	62	2	0,375	0,6
57	4	48	5	0,875	1,8
58	4	31	0	0	0
59	4	34	0	0	0
61	4	33	2	0,25	0,7
63 ^a	4	96	6	1,125	1,17
66 ^d	3	35	1	0,125	0,7
67	4	70	1	0,125	0,17
68	4	51	0	0	0
69	4	55	3	0,5	0,65
71	4	47	1	0,25	0,53
72	4	44	1	0,25	1,04
73	4	48	4	0,625	1,3
75	4	69	1	0,125	0,18
77	4	66	1	0,125	0,18
78	4	31	2	0,25	0,8
79 ^a	3	75	4	0,75	1
80	4	54	1	0,0625	0,12
83	4	49	1	0,125	0,255
84	4	27	3	0,375	1,38
85 ^b	3	42	2	0,625	1,49
86 ^c	3	15	1	0,5	3,3
87 ^c	3	15	1	0,5	3,3
88	4	57	5	0,875	1,5
89	3	25	2	0,5	2

a) parentes em terceiro grau e tumores adrenocorticais em familiares; b) meio-irmão e avô materno; c) meio-irmãs; d) prima. Σ = Somatório dos valores relativos ao grau de parentesco; % Σ = índice relativo de grau de parentesco genético.

6.3 ANÁLISE DO GENE DA PROTEÍNA P53 EM LINFÓCITOS DE PACIENTES

O seqüenciamento do gene TP53 foi realizado em amostra de sangue periférico de 31 pacientes.

Em 10, foram analisados inicialmente apenas os exons 5 a 9. Foi estudada esta área em decorrência da alta incidência de mutações observadas nesta região. (LEVINE, 1991; HOLLSTEIN, 1991; FROMENTEL, 1992; GRAYSON, 1994; GREENBLAT, 1994; FREBOURG, 1995). Contudo, em apenas 2 foi possível analisar toda a região, havendo problemas técnicos na realização dos exames dos demais.

Na seqüência foi estudado também o exon 10 das amostras de 8 destes pacientes.

Vinte e um pacientes tiveram os exons 2 a 11 analisados.

Em todos os 29, foi observada mutação no exon 10, codon 337, nucleotídeo 1010, com substituição de uma base purina guanina (CGC) por outra, adenina (CAC), que resulta em substituição do aminoácido arginina por histidina.

TABELA 2 - NÚMERO DO PROTOCOLO DOS PACIENTES QUE TIVERAM O SEQÜENCIAMENTO DO GENE TP53, SEU REGISTRO NO HOSPITAL, EXONS ESTUDADOS E RESULTADOS

PACIENTE	EXONS ESTUDADOS	MUTAÇÃO	EXON MUTADO	CODON	NUCLEOTÍDEO
28	2 a 11	Sim	10	337	1010
30	2 a 11	Sim	10	337	1010
34	2 a 11	Sim	10	337	1010
35	2 a 11	Sim	10	337	1010
38	6,8,9,10	Sim	10	337	1010
41	5,8,9	Não			
42	2 a 11	Sim	10	337	1010
43	2 a 11	Sim	10	337	1010
49	2 a 11	Sim	10	337	1010
50	2 a 11	Sim	10	337	1010
55	5,8,9,10	Sim	10	337	1010
56	6,8,9,10	Sim	10	337	1010
57	5 a 10	Sim	10	337	1010
58	5,6,9	Não			
59	5,9,10	Sim	10	337	1010
63	2 a 11	Sim	10	337	1010
64	8,9,10	Sim	10	337	1010
66	2 a 11	Sim	10	337	1010
68	2 a 11	Sim	10	337	1010
70	5,9,10	Sim	10	337	1010
71	2 a 11	Sim	10	337	1010
75	2 a 11	Sim	10	337	1010
77	2 a 11	Sim	10	337	1010
78	5,6,8,9,10	Sim	10	337	1010
79	2 a 11	Sim	10	337	1010
84	2 a 11	Sim	10	337	1010
85	2 a 11	Sim	10	337	1010
86	2 a 11	Sim	10	337	1010
87	2 a 11	Sim	10	337	1010
88	2 a 11	Sim	10	337	1010
89	2 a 11	Sim	10	337	1010

Também foram analisados pai e mãe dos pacientes 86 e 89; a mãe dos pacientes 50, 64, 87, 88 e 90; e mãe e 3 irmãos do paciente 80. A amostra de sangue periférico de 12 familiares dos pacientes número 50, 64, 79, 86, 87 e 88, 89 e 90 (tabela 3).

As mães dos pacientes 50, 64, 80, 86, 87, 89 e 90 foram estudadas; com exceção da mãe do paciente 64, todas apresentavam a mesma anomalia do gene TP53 que os filhos. Do paciente 80 foram estudados a mãe e 3 irmãos, sendo que somente a mãe apresentou mutação no gene TP53. Dos pacientes 86 e 89 foram estudados pai e mãe; em ambos os casos as mães apresentavam o gene mutado e os pais o gene normal.

TABELA 3 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 2 A 11 DO GENE DA PROTEÍNA P53 EM AMOSTRA DE SANGUE PERIFÉRICO DE PARENTES DE PACIENTES

AMOSTRA	PARENTESCO COM PACIENTE	MUTAÇÃO OBSERVADA	EXONS ESTUDADOS
I N	Mãe de 64	Não	2 a 11
T B	Mãe de 79	Codon 337, CGC→CAC	2 a 11
A B	Irmão de 79	Não	2 a 11
N B	Irmã de 79	Não	2 a 11
N B	Irmã de 79	Não	2 a 11
S F	Pai de 86	Não	2 a 11
L F	Mãe de 86	Codon 337, CGC→CAC	2 a 11
M C T	Mãe de 87 e 88	Codon 337, CGC→CAC	2 a 11
V A C	Mãe de 90	Codon 337, CGC→CAC	2 a 11
A D	Pai de 89	Não	2 a 11
S L C	Mãe de 89	Codon 337, CGC→CAC	2 a 11
M S	Mãe de 50	Codon 337, CGC→CAC	2 a 11

Com a finalidade de comparar as análises de mutações germinativas do gene da proteína p53, foram avaliados 13 pacientes cadastrados no St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Estados Unidos

Desses pacientes, um era brasileiro, proveniente do Estado do Rio de Janeiro, os demais, norte-americanos. Dois eram do sexo masculino e 10 feminino. O ano de diagnóstico variou de 1986 e 1995. Onze pacientes tinham idade inferior a 5 anos por ocasião do diagnóstico.

Foi colhido sangue periférico e realizado o sequenciamento do gene TP53, dos exons 5 a 9 em 8 pacientes e do 5 a 10 em 5 pacientes, no mesmo laboratório e

com uma metodologia igual à aplicada aos pacientes brasileiros. Os resultados são apresentados na tabela 4.

TABELA 4 - INICIAIS DOS PACIENTES PROVENIENTES DO NO ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL SUBMETIDOS AO SEQUENCIAMENTO DOS EXON 5 A 9 OU 5 A 10, DO GENE TP53 A PARTIR DE LINFÓCITOS E RESPECTIVAS MUTAÇÕES OBSERVADAS

PACIENTE	EXON	CODON	BASES	AMINOÁCIDO
G S	7	248	CGG → TGG	Arginina → Triptofano
E N				
K S(*)				
J W(*)	6	196	CGA → TGA	Arginina → codon de parada
A T				
J B				
K L	6	219	CCC → TCC	Prolina → Serina
C C*				
C H				
S V S(*)	6	213	CGA → CAA	Arginina → Glutamina
C H K				
R I J				
T O (**)				

(*) Pacientes submetidos ao sequenciamento do exon 5 a 10 do gene TP53 provenientes do St. Jude Children's Research Hospital.

(**) Paciente submetido ao sequenciamento do exon 5 a 10 do gene TP53 proveniente do Rio de Janeiro.

Ao contrário dos pacientes da UEP, o grupo do St Jude Children's Research Hospital apresentou mutações em 4 dos 13 pacientes estudados: 3 mutações ocorreram nos exons 6, codons 196, 213 e 219, e uma no exon 7, codon 248.

Foi estudado o exon 10 de 5 dos 9 pacientes que apresentaram o sequenciamento do gene da proteína p53 normal entre os exons 5 a 9. Também, ao contrário dos pacientes de Curitiba, em todos eles o resultado da análise deste exon foi normal, incluindo o paciente TO, proveniente do Brasil, do Estado do Rio de Janeiro.

7 DISCUSSÃO

7.1 IDADE E SEXO

Há um evidente predomínio (82%) de pacientes com idade igual ou inferior a 5 anos (figura 5), sendo a mediana de 2,33 anos. Estes dados mostram que persiste esta tendência em nosso meio, já descrita anteriormente por Sandrini et al. (1997) que, em estudo realizado no Paraná, observaram 80,7% de seus 58 pacientes com idade igual ou inferior a 5 anos no momento do diagnóstico.

Também em São Paulo, Marigo et al. (1969) registraram uma média de idade, nos pacientes pediátricos com tumores adrenocorticais, de 5,1 anos, sendo que 67% deles tinham idade igual ou inferior a 5 anos. No Hospital de Clínicas de São Paulo, entre os anos de 1980 e 1992, de 18 pacientes pediátricos com tumor adrenocortical, 16 (88,8%) possuíam idade igual ou inferior a 5 anos no diagnóstico (MENDONÇA et al., 1995).

Na América do Sul, Bergadá et al. (1996), na Argentina, encontraram uma média de idade em seus estudos de 7,1 anos em pacientes pediátricos. A incidência dos tumores adrenocorticais em crianças com idade inferior a 5 anos foi de 50%.

Na América do Norte, Mayer et al. (1997), no Canadá, observaram uma média de idade, nos 11 pacientes pediátricos com tumores adrenocorticais, de 7,4 anos. Quatro tinham idade inferior a 5 anos.

Na Europa, Federici et al. (1994), Bolonha, Itália, e Hartley et al., 1996, na Inglaterra, observaram que 66% e 50%, respectivamente, dos pacientes tinham idade igual ou inferior a 5 anos. A média de idade do estudo italiano foi de 4,9 anos, enquanto a do britânico foi de 5,3 anos.

A incidência de tumores adrenocorticais neste estudo foi maior em pacientes do sexo feminino que do masculino, 3,2:1 (Figura 4). Quando comparados pacientes com idade inferior a 5 anos, esta relação foi maior 4,86:1. (figura 5).

Sandrini et al. (1997) já haviam registrado no nosso meio um predomínio do sexo feminino sobre o masculino de 5,3:1 em pacientes com idade até 4 anos. A partir de 5 anos a distribuição foi semelhante entre os sexos.

Marigo et al. (1969) observaram uma relação entre pacientes femininos e masculinos de 2:1; contudo, esta relação foi de 3,5:1 quando avaliados pacientes com idade igual ou inferior a 5 anos.

Mayer et al. (1997), em seu estudo canadense, observaram uma relação de 2,7 meninas para 1 menino, e quando avaliados somente pacientes com idade igual ou inferior a 5 anos esta relação foi, diferentemente de nossa amostra, de 1:1.

Federici et al. (1994), Itália, em 13 pacientes pediátricos, e Lack et al. (1992), Estados Unidos, em 30 pacientes pediátricos observaram uma tendência de incidência aumentada no sexo feminino que no masculino (relação de 1,4:1 e 1,5:1, respectivamente), a relação feminino:masculino com faixas etárias igual ou menores a 5 anos praticamente semelhante à população total do estudo (1,3:1 e 1,6:1 respectivamente).

Bergadá et al. (1996), na Argentina, identificaram uma relação da incidência de 3 casos femininos para cada caso do sexo masculino. Este predomínio de incidência no sexo feminino foi maior quando avaliados pacientes com idades superiores a 5 anos (4:1), ao contrário do que foi observado neste estudo.

7.2 RELAÇÃO COM CÂNCERES FAMILIARES

O presente estudo avaliou 46 famílias de pacientes com diagnóstico de tumores adrenocorticais em idade inferior a 14 anos. Em nenhuma família foram detectados os parâmetros que preenchessem os critérios para a forma clínica de síndrome de Li-Fraumeni clássica ou "*Li-Fraumeni-like*".

Na literatura, é habitual a presença do síndrome de Li-Fraumeni entre os pacientes pediátricos com tumores adrenocorticais. Hartley et al. (1987) encontraram 2 famílias com o síndrome em 5 famílias estudadas; Tsunematsu et al. (1991) 7 casos entre 47 pacientes e Wagner et al. (1994), um caso de síndrome de Li-Fraumeni entre 6 pacientes com tumor adrenocortical.

Em 8 famílias não houve relato de nenhum outro caso de câncer (tabela 1). Em 24 havia história esporádica de câncer [índice relativo de grau de parentesco genético (IRGPG) menor que 1,1] e em 14 famílias detectou-se uma incidência elevada de câncer. (IRGPG maior que 1,1).

Utilizando o método de índice relativo de grau de parentesco genético, aplicado aos pacientes descritos em relatos de síndrome de Li-Fraumeni ou “*Li-Fraumeni-Like*” (tabela 5), observou-se que este valor é superior ao encontrado na amostra desta pesquisa (tabela 1).

A média de índice relativo de grau de parentesco genético nos artigos revisados foi de 12,01 ($\pm 6,1$) e mediana de 10,7. O menor índice observado em uma família foi de 2,9 e o maior, de 28,57.

Na presente amostra (tabela 1), a média do índice relativo de grau de parentesco genético foi de 0,867 ($\pm 0,876$), mediana de 0,67 com valores de zero a 3,5. Das 46 famílias estudadas, apenas 2 apresentaram índice maior que 3. Das 59 famílias com o síndrome de Li-Fraumeni ou “*Síndrome de Li-Fraumeni-like*”, revisadas da literatura, apenas uma apresentava índice inferior a 3. Isto demonstra que a história de presença de câncer em outros membros das famílias de nossos pacientes é menor que no apresentado no síndrome de Li-Fraumeni.

Em 4 famílias do presente estudo, havia mais de um membro com tumor adrenocortical na infância (tabela 1). Nestas famílias o índice relativo de grau de parentesco genético foi 0,7; 1,17; 1,49 e 3,3; isto evidencia que não há relação entre a presença de mais de um tumor adrenocortical na infância e elevada frequência de cânceres na família.

TABELA 5 - APLICAÇÃO DE ÍNDICE RELATIVO DE GRAU DE PARENTESCO GENÉTICO. NAS FAMÍLIAS RELATADAS NA LITERATURA COMO PORTADORAS DE SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E COM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER EM 2 OU MAIS GERAÇÕES

REFERÊNCIA	NÚMERO DE FAMILIARES ESTUDADOS	Σ	% Σ	NÚMERO DE GERAÇÕES ESTUDADAS	TUMOR ADRENAL
PLUMMER et al., 1994	31	2,66	8,58	4	não
HARTLEY et al., 1987	30	0,87	2,91	4	sim
BIRCH et al., 1994	5	1	20	2	sim
	5	1	20	2	não
	7	2	28,57	2	não
	6	1	16,66	2	não
	5	1	20	2	não
	8	0,5	6,25	2	não
	7	0,75	10,71	2	não
	10	1,25	12,5	2	sim
	7	0,75	10,71	2	não
	5	0,75	15	2	não
	5	1,25	25	2	sim
	12	1	8,33	2	não
	12	1,12	9,37	3	sim
	7	0,75	10,71	3	não
	5	1	20	2	não
	7	0,62	8,92	3	não
	5	0,75	15	3	não
	7	0,75	10,71	2	não
	6	1	16,66	2	não
	5	0,75	15	3	não
	5	0,75	15	2	sim
BRUGIÈRES et al., 1993	23	2,18	9,51	3	não
	4	0,5	12,5	2	não
	8	0,62	7,81	3	não
BARNES et al., 1992	16	1,18	7,375	4	não
DOCKHORN et al., 1996	18	1,5	8,33	3	não
GARBER et al., 1991	11	2,5	22,72	3	não
LAW et al., 1991	35	2,18	6,25	4	não
KOVAR et al., 1992	34	1,5	4,41	4	não
LI et al., 1969	32	1,32	4,15	5	não
	8	1,5	18,75	3	não
	8	1,62	20,31	4	não
	7	1,62	23,21	4	não
WAGNER et al., 1994	13	1,12	8,65	4	sim
VARLEY et al., 1996	24	4	16,66	4	não
LYNCH et al., 1985	68	5,14	7,55	5	sim
MALKIN et al., 1990	13	1,25	9,61	3	não
	24	1,12	4,68	3	não
	11	1	9,09	3	não
	8	1,12	14,06	3	não
	15	2	13,33	3	não
STRAUSS et al., 1995	43	2	4,65	4	sim
TSUNEMATSU et al., 1991	19	2,12	11,18	3	sim
	15	0,5	3,33	3	sim
	15	0,5	3,33	3	sim
	27	2,37	8,79	4	sim
	18	0,75	4,16	3	sim
	15	1,87	12,5	3	sim
	44	1,62	3,69	3	sim
TSUKAMOTO et al., 1992	25	2,12	8,5	3	sim
SEDLACEK et al., 1998	9	1	11,11	4	sim
	14	1,87	13,39	4	sim
SRIVASTAVA et al., 1990	13	2,75	21,15	3	não
SAMESHIMA et al., 1992	14	1,87	13,39	3	sim
	16	1,62	10,15	3	sim
STOLZENBERG et al., 1994	7	1,25	17,85	3	sim
SAEKI et al., 1997	36	2,12	5,90	4	não

Σ = Somatório dos valores de Malécot; % Σ = índice relativo de grau de parentesco genético; n = número de familiares estudados; * o probando possuíam tumor adrenocortical

A presença de tumor adrenocortical na infância em mais de um membro da família foi relatada apenas por Sedlacek(1) et al. (1998), em uma família com o síndrome de Li-Fraumeni, que apresentava duas irmãs com tumor adrenocortical aos 1,5 e 0,5 anos.

Com exceção da presente casuística, não há nenhum relato de tumor adrenocortical em mais de um membro da família e que esta não preencha os critérios para o diagnóstico do síndrome de Li-Fraumeni.

7.3 ANÁLISE GERMINATIVA DO GENE TP53

7.3.1 Mutações no Exon 10

Todos os pacientes desta amostra apresentaram mutação exon 10, no codon 337, na base 1010, com substituição do aminoácido arginina, de codon CGC, pelo histidina, de codon CAC (tabela 2), um local infrequente de observações de mutação do gene TP53. (GREENBLAT et al., 1994; KLEIHUES et al,1997)

Na amostra de 13 pacientes registrados no St. Jude Children's Research Hospital, Estados Unidos, foram observadas mutações em 4 pacientes, todos em codons diferentes (196, 213, 219 e 248) nos exons 6 e 7 (tabela 4).

Não há na literatura nenhuma descrição de crianças com tumor adrenocortical esporádico que apresente alteração semelhante à encontrada nesta amostra.

A única citação de mutação germinativa no codon 337, no base 1010, com substituição do aminoácido arginina (CGC), pelo histidina (CAC), semelhante ao encontrado neste estudo está referida no "*Thiery Soussi Database*" (CARIELLO et al., 1994) como comunicação pessoal de J. Feunteun, em 1 paciente com síndrome de Li-Fraumeni, sem citar o tipo de tumor.

Pacientes com tumores adrenocorticais, que tiveram o gene TP53 germinativo estudado, geralmente apresentam síndrome de Li-Fraumeni e mutações

nas áreas consideradas “*hot spots*”, entre exons 4 e 9. (SAMESHIMA, 1992; BIRCH, 1994; TENOUTASSE, 1997; LECOINTRE, 1997; VARLEY, 1997).

Kleihues et al. (1997) registraram mutações germinativas do p53, principalmente entre exons 5 e 8.

Wagner et al. (1994), em estudo do gene TP53 em 6 crianças com tumores adrenocorticais, observaram mutação germinativa nos exons 5, 6 e 7. Um dos pacientes com a mutação era membro de uma família com o síndrome de Li-Fraumeni; os demais eram tumores esporádicos.

7.3.2 Mutações no Codon 337

A região entre codons 326 e 354 do gene é responsável pela tetramerização da proteína p53. (SOUSSI e MAY, 1996; STÜRZBECHER et al., 1992).

Mutações somáticas têm sido relatadas no exon 10 codon 337. Chi et al. (1994) descrevem uma mutação somática no codon 337 em câncer de próstata, porém, com a substituição da arginina (CGC) por leucina (CUC). Casey et al. (1996) observaram em tumor de mama a substituição de arginina (CGC) por cisteína (UGC).

Lomax et al. (1997) descrevem a mutação germinativa do codon 337, em uma família com o síndrome de Li-Fraumeni. Foi observada a troca de arginina (CGC) por cisteína (UGC).

Luca et al. (1998) observaram mutação germinativa em um paciente com osteossarcoma, no codon 337 com a substituição da arginina por cisteína (UGC).

Plummer et al. (1994) descrevem uma família com o síndrome de Li-Fraumeni, e com deleção completa do exon 10. Clinicamente esta família caracterizava-se pela presença de tumores em idade tardia, se comparada com outras famílias com o mesmo síndrome.

Estes dados apontam para a importância de realizar triagem de mutação em regiões não consideradas como “*hot spots*”, principalmente em cânceres não frequentes.

7.3.3 Substituição CGC por CAC

A mutação observada neste estudo ocorreu entre duas bases purinas e em região considerada de transição citosina-guanina (CpG).

As mutações de ponto onde ocorre substituição de uma base nitrogenada de mesmo grupo, isto é, uma purina por outra purina, como a da nossa amostra, ou uma pirimidina por outra pirimidina, são denominadas de mutações de transição e ocorrem com mais frequência. (LEWIN, 1997)

Hollstein et al. (1991) observaram que, entre todos os tipos de câncer, a substituição guanina por adenina, em qualquer exon, ocorreu em 50% dos tumores, sendo que 32% delas foram verificadas na transição citosina-guanina (CpG).

A transição citosina-guanina (CpG) são várias regiões do DNA. Estas regiões podem sofrer metilação, e conseqüente fragmentação, espontânea pela 5-metilcitosina, uma enzima de fragmentação (LEWIN, 1997), sendo, por isso, os locais mais freqüentes de mutação. (FROMENTEL et al., 1992; SOUSSI et al., 1994; GREENBLATT et al., 1994).

As mutações observadas nesta amostra ocorreram todas em uma região considerada não “*hot spot*” e em um mesmo codon, diferente do encontrado na amostra provenientes dos Estados Unidos. Este dado sugere um fator étnico ou ambiental característico da região deste estudo como predisponente para surgimento do tumor.

7.3.4 Mutação e Fatores Ambientais

Greenblat et al. (1994) sugerem que agentes carcinogênicos podem promover mutações diferentes em tecidos diferentes. Por exemplo: o tabaco é um agente carcinogênico para pulmão e esôfago, porém a substituição mais freqüentemente observada em câncer de pulmão foi guanina por adenina, enquanto no de esôfago foi da citosina por timina.

Horio et al. (1994) estudaram uma família com história de câncer gástrico em 3 gerações consecutivas, que não preenchia os critérios do síndrome de Li-Fraumeni, e observaram uma mutação germinativa no gene TP53 (codon 213) dos indivíduos estudados. Sugeriram que a heterogenicidade de manifestações clínicas depende do tipo de mutação do p53, bem como de fatores genéticos prévios e fatores ambientais.

O aumento de câncer de pâncreas em trabalhadores de uma indústria química levou à realização de uma avaliação dos fatores de risco associados a esta patologia. Dos fatores estudados, somente a exposição ao 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano (DDT) e alguns de seus derivados aumentaram o risco de câncer pancreático. O DDT aumenta em 7,4 vezes quando há uma exposição em média de 47 meses; o Etilan eleva em 5,8 vezes em exposição durante 37 meses e o DDD, 5,5 vezes com a exposição por 27 meses. (GARABRANT et al., 1992)

Hartley et al. (1987) indicaram influência de materiais tóxicos no desenvolvimento de tumores adrenocorticais.

Sandrini et al. (1997) apontaram que a incidência elevada de tumores adrenocorticais na infância que ocorre no Estado do Paraná, pode ser decorrente de exposição excessiva a agrotóxicos.

A incidência aumentada de um tipo de tumor com o diagnóstico nos primeiros anos de vida sugere que o fator ambiental carcinogênico teve sua atuação antes do nascimento ou até mesmo antes da concepção. (STILLER et al., 1992)

Chin et al. (1994) sugeriram que agentes mutagênicos específicos de um ambiente, poderiam provocar mutações em regiões específicas do gene.

Schatzkin et al. (1995) relacionaram prováveis causas tumorogênicas com a presença de uma mutação germinativa como:

- 1) Gene mutado: a presença de um gene mutado seria o suficiente para progressão de um câncer;
- 2) Gene mutado mais influência de um 2º gene: há a necessidade de um segundo gene para estabelecer a doença;

- 3) Gene mutado mais influência de um fator ambiental: o gene seria um fator predisponente para que um fator ambiental induzisse ao câncer, e
- 4) Gene mutado mais influência de um 2º gene em mais um fator ambiental: dois gene mutados, um germinativo e um somático, associados ao fator ambiental resultariam em doença.

A mutação germinativa encontrada em todos os pacientes desta pesquisa sugere que a patogênese dos tumores adrenocorticais na região em estudo é decorrente de um gene mutado (p53 germinativo) resultante de um fator ambiental mais outra mutação somática ainda não descrita; ou p53 germinativo mutado associado a uma mutação somática decorrente de um fator ambiental.

CONCLUSÕES

- A presença de tumores adrenocorticais na infância na Região Sul do Brasil não está relacionada com a presença de cânceres em familiares.
- Tumores adrenocorticais na infância na Região Sul do Brasil estão relacionados à mutação germinativa no gene TP53, no exon 10, codon 337, base 1010, com substituição de arginina (CGC) por histidina (CAC).
- Tumores adrenocorticais na infância em pacientes do Sul do Brasil mostram mutações gênicas diferente dos pacientes norte-americanos.

ANEXOS

ANEXO 1 - INICIAIS DO NOME, DATA DE NASCIMENTO, IDADE E ANO DE DIAGNÓSTICO,
SEXO E NÚMERO DE REGISTRO E NÚMERO DO PROTOCOLO DO PACIENTE

PACIENTE	ANO DE NASCIMENTO	SEXO	NÚMERO DE REGISTRO	NÚMERO DO PROTOCOLO
VFS	1963	fem	474460	01
IJF	1961	masc	3003230	02
IRJ	1964	fem	990620	03
MJP	1965	fem	5330262	04
SGA	1965	masc	5360870	05
NFR	1970	fem	5378214	06
DP	1967	fem	5446686	07
RCC	1961	fem	5663881	08
EK	1972	fem	5546672	09
NMSF	1958	fem	5761433	10
EAS	1967	fem	5710448	11
LRR	1970	fem	5720125	12
JO	1952	masc	3105938	13
SFC	1957	fem	454052	14
CMF	1970	fem	5638020	15
NLZ	1977	fem	4852648	16
VD	1977	fem	8094098	17
MF	1979	fem	8233667	18
OCK	1980	fem	6022146	19
JGS	1977	fem	8234264	20
AS	1980	fem	7251114	21
AZ	1980	fem	6117759	22
SM	1979	masc	6103286	23
KBR	1979	fem	8417890	24
GRC	1982	fem	6524869	25
KCF	1977	fem	4543912	26
MS	1976	fem	6260608	27
NFR	1980	fem	6551564	28
SM	1982	fem	6748619	29
JML	1981	masc	8621519	30
LCC	1982	masc	6759289	31
WT	1984	masc	6988083	32
CAL	1978	masc	2101033	33
AMS	1982	fem	2249529	34
VM	1987	fem	2533065	35
MFL	1985	fem	9050930	36
VAS	1980	fem	9121714	37
RMBS	1985	fem	9127941	38
KGM	1987	fem	9309160	39
DAF	1988	fem	9112286	40
SO	1997	fem	10017424	41
GAL	1977	masc	10062586	42
HS	1987	masc	10224764	43
PAP	1987	fem	9215239	44
JCP	1989	fem	10337259	45
JCP	1979	masc	10451744	46
LAL	1987	masc	10507359	47
JRM	1985	masc	2009234	48
ACCF	1990	fem	10703107	49

continua

ANEXO 1 - INICIAIS DO NOME, DATA DE NASCIMENTO, IDADE E ANO DE DIAGNÓSTICO,
SEXO E NÚMERO DE REGISTRO E NÚMERO DO PROTOCOLO DO PACIENTE

conclusão

PACIENTE	ANO DE NASCIMENTO	SEXO	NÚMERO DE REGISTRO	NÚMERO DO PROTOCOLO
MFSS	1990	fem	11627951	50
JNA	1990	fem	7454635	51
APBS	1978	fem	11760074	52
FAO	1990	fem	12083440	53
AAJ	1990	fem	11864481	54
BFL	1989	fem	11845231	55
JF	1988	fem	11100112	56
MSA	1993	fem	13424730	57
CR	1993	fem	13509050	58
BAM	1992	fem	13902186	59
PRC	1989	masc	14058028	60
ECJ	1994	masc	14862765	61
RAN	1986	masc	14854193	62
MN	1994	fem	13843856	63
KLMS	1992	fem	14556060	64
EK	1972	fem	5546672	65
CB	1993	fem	13876738	66
CAR	1973	masc	8211582	67
PS	1987	fem	9395156	68
RRM	1983	masc	8775641	69
SR	1989	fem	14691219	70
AFM	1991	fem	15710403	71
ALS	1996	masc	15865814	72
BKMB	1996	fem	15252162	73
CB	1972	fem	577637	74
DMA	1996	fem	14978593	75
EWV	1970	masc	outro serviço	76
EQ	1994	fem	15304677	77
JSB	1986	fem	14303010	78
LFB	1996	fem	15385200	79
RPS	1980	fem	12057261	80
SM	1986	fem	12252781	81
TBR	1993	fem	13123306	82
TSR	1995	fem	15667646	83
ACAR	1995	fem	15717092	84
CF	1987	fem	16278378	85
JT	1993	fem	outro serviço	86
TT	1984	fem	outro serviço	87
KSD	1994	fem	16194646	88
AAC	1997	fem	15706821	89

ANEXO 2 - NÚMERO DO PROTOCOLO, ANO E IDADE DO DIAGNÓSTICO, E SEXO DO PACIENTE

NÚMERO DO PROTOCOLO	ANO DE DIAGNÓSTICO	IDADE DE DIAGNÓSTICO	SEXO	HISTOLOGIA
01	1966	3a2m	fem.	Carcinoma
02	1966	5a2m	masc.	Carcinoma
03	1968	3a11m	fem.	Carcinoma
04	1971	5a10m	fem.	Carcinoma
05	1971	6a7m	masc.	Carcinoma
06	1971	1a9m	fem.	Carcinoma
07	1972	4a11m	fem.	Carcinoma
08	1975	3a10m	fem.	Carcinoma
09	1973	1a3m	fem.	Carcinoma
10	1976	7a8m	fem.	Carcinoma
11	1975	8a	fem.	Carcinoma
12	1975	5a7m	fem.	Carcinoma
13	1968	15a9m	masc.	Adenoma
14	1971	8a4m	fem.	Carcinoma
15	1974	3a11m	fem.	Carcinoma
16	1980	3a8m	fem.	Carcinoma
17	1980	3a6m	fem.	Carcinoma
18	1981	2a9m	fem.	Carcinoma
19	1981	1a6m	fem.	Carcinoma
20	1981	3a8m	fem.	Carcinoma
21	1980	3d	fem.	Carcinoma
22	1982	1a8m	fem.	Carcinoma
23	1982	3a2m	masc.	Carcinoma
24	1983	3a8m	fem.	Carcinoma
25	1984	1a7m	fem.	Carcinoma
26	1979	1a8m	fem.	Carcinoma
27	1983	6a5m	fem.	Carcinoma
28	1984	3a3m	fem.	Carcinoma
29	1985	2a10m	fem.	Carcinoma
30	1985	4a1m	masc.	Carcinoma
31	1985	3a	masc.	Carcinoma
32	1986	1a10m	masc.	Carcinoma
33	1986	8a	masc.	Carcinoma
34	1987	4a10m	fem.	Carcinoma
35	1988	1a	fem.	Carcinoma
36	1989	5a7m	fem.	Carcinoma
37	1989	8a10m	fem.	Carcinoma
38	1989	3a11m	fem.	Carcinoma
39	1990	3a	fem.	Carcinoma
40	1990	2a	fem.	Carcinoma
41	1990	2a8m	fem.	Carcinoma
42	1990	13a5m	masc.	Carcinoma
43	1990	3a	masc.	Carcinoma
44	1989	1a11m	fem.	Adenoma
45	1990	1a6m	fem.	Carcinoma
46	1991	11a8m	masc.	Carcinoma
47	1991	3a11m	masc.	Carcinoma
48	1991	5a11m	masc.	Carcinoma
49	1991	1a3m	fem.	Carcinoma
50	1992	1a3m	fem.	Carcinoma
51	1992	2a	fem.	Carcinoma
52	1992	13a5m	fem.	Carcinoma

continua

ANEXO 2 - NÚMERO DO PROTOCOLO, ANO E IDADE DO DIAGNÓSTICO, E SEXO DO PACIENTE
conclusão

NÚMERO DO PROTOCOLO	ANO DE DIAGNÓSTICO	IDADE DE DIAGNÓSTICO	SEXO	HISTOLOGIA
53	1992	2a5m	fem.	
54	1992	1a9m	fem.	Carcinoma
55	1992	4a2m	fem.	Carcinoma
56	1991	4a2m	fem.	Carcinoma
57	1994	4m	fem.	Carcinoma
58	1995	1a2m	fem.	Carcinoma
59	1995	2a2m	fem.	Adenoma
60	1995	5a7m	masc.	Carcinoma
61	1996	1a11m	masc.	Carcinoma
62	1996	9a6m	masc.	Carcinoma
63	1994	9m	fem.	Carcinoma
64	1995	3a	fem.	Carcinoma
65	1973	1a3m	fem.	Carcinoma
66	1994	10m	fem.	Carcinoma
67			masc.	Carcinoma
68	1989	9m	fem.	Carcinoma
69	1986	3a3m	masc.	Adenoma
70	1995	6a10m	fem.	Carcinoma
71	1997	5a8m	fem.	Adenoma
72	1997	1a	masc.	Carcinoma
73	1996	1a5m	fem.	Carcinoma
74	1974	4a	fem.	Carcinoma
75	1997	1a6m	fem.	Adenoma
76	1975	4a10m	masc.	Carcinoma
77	1997	2a11m	fem.	Adenoma
78	1987	1a5m	fem.	Adenoma
79	1996	9m18d	fem.	Carcinoma
80	1992	12a1m	fem.	Carcinoma
81	1992	6a7m	fem.	
82	1996	2a7m	fem.	Carcinoma
83	1997	2a3m	fem.	Adenoma
84	1997	1a11m	fem.	Adenoma
85	1998	11a	fem.	Carcinoma
86	1998	5a	fem.	Carcinoma
87	1985	1a	fem.	Carcinoma
88	1998	3a9m	fem.	Carcinoma
89	1998	9m	fem.	Adenoma

ANEXO 3 - HEREDOGRAMAS DE FAMÍLIAS QUE APRESENTAM HISTÓRIA DE MAIS DE UM MEMBRO COM TUMOR DE ADRENOCORTICAL

Legenda:

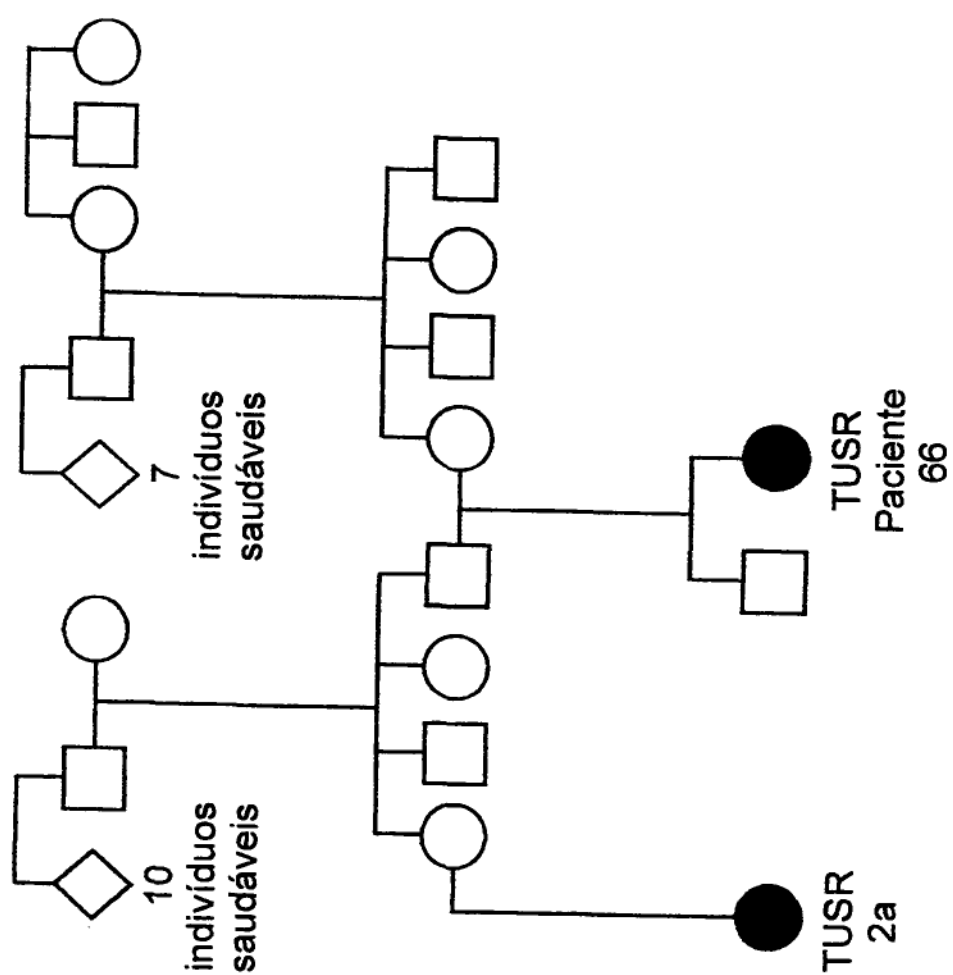
□ e ○ = não afetados por câncer

■ e ● = afetados por câncer e identificação do paciente relacionado a este trabalho; ou idade de diagnóstico em familiares do paciente e sinais e sintomas associados à história de câncer

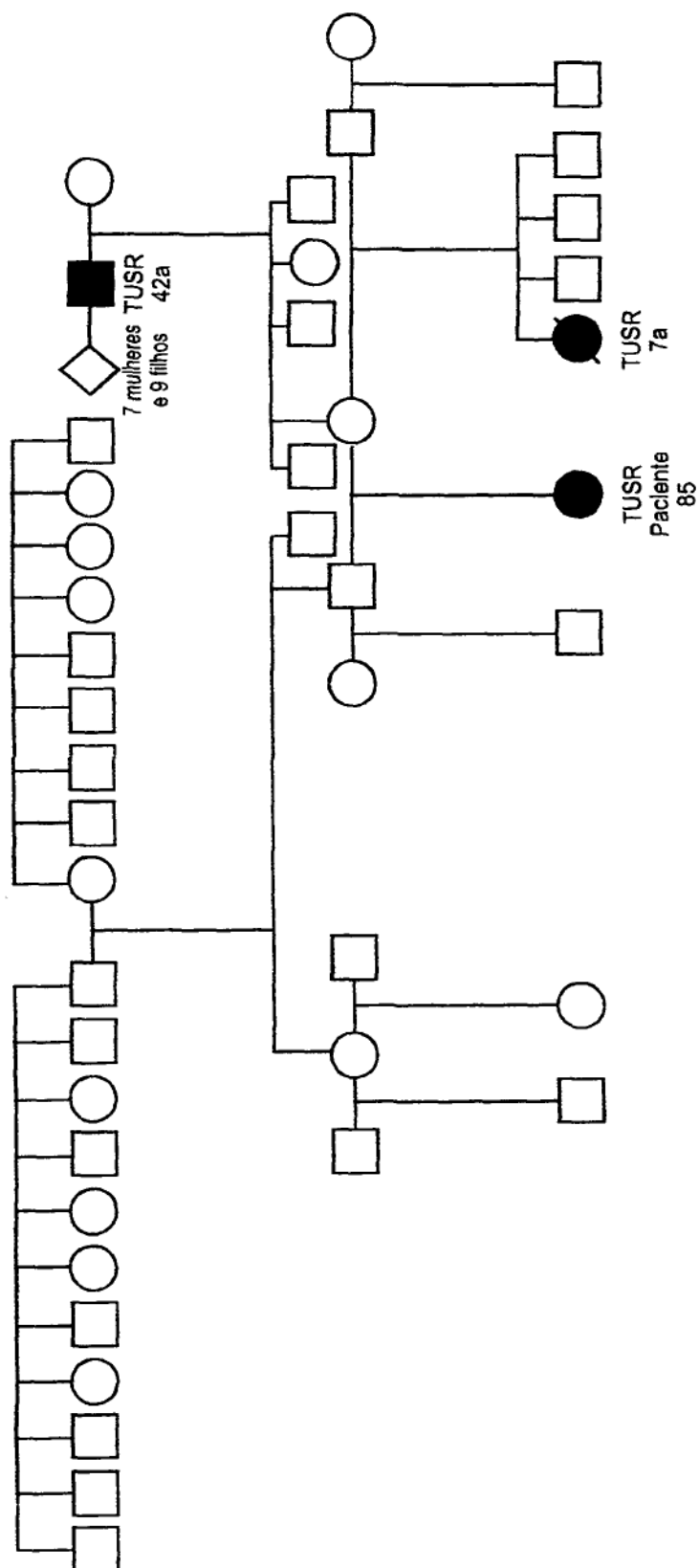
TUSR = portador de tumor adrenocortical

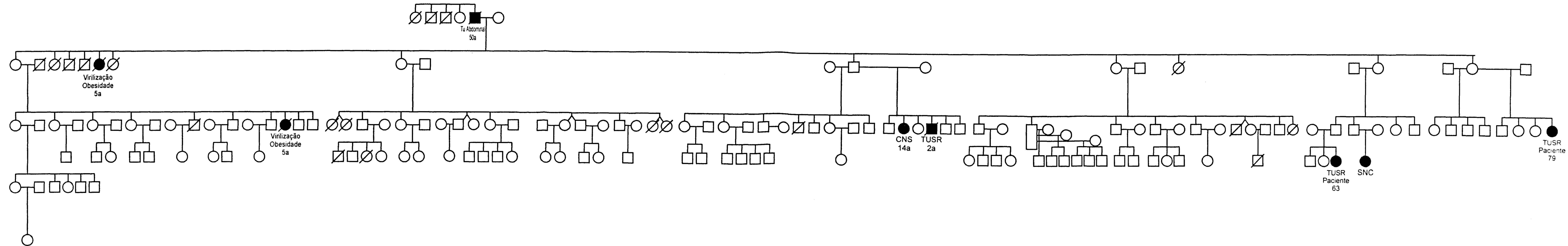
CNS = portador de tumor em Sistema Nervoso Central

Heredograma do paciente 66



Heredograma do paciente 85





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABRAMSON, S. J. Adrenal Neoplasm in Children. **Radiologic Clinics of North América**. v.35, n.6, p.1415-1453, nov. 1997.
- 2 BARNES, D. M.; HANBY, A. M.; GILLET, C. E.; MOHAMMED, S.; HODGSON, S.; BOBROW, L. G.; LEIGH, I.M.; PURKIS, T.; MACGEOCH, C.; SPURR, N. K.; BARTEK, J.; VOJTESEK, B.; PICKSLEY, S.M.; LANE, D.P. Abnormal Expression of Wild Type p53 Protein in Normal Cells of a Cancer Family Patient. **Lancet**. v.340, p.259-263, Aug 1, 1992.
- 3 BARZILAY, J. I.; PAZIANOS, A. G. Adrenocortical Carcinoma. **Urologic Clinics of North America**. v.16, n.3, p.457-467, Aug. 1989.
- 4 BARZON, L.; FALLO, F.; SONINO, N.; DANIELE, O.; BOSCARO, M. Adrenocortical Carcinoma, Experience in 45 Patients. **Oncology**. v.54, n.6, p.490-496, Dec. 1997.
- 5 BERGADÁ, I.; VENARA, M.; MAGLIO, S.; CIACCIO, M.; DIEZ, B.; BERGADÁ, C.; CHEMES, H. Functional Adrenal Cortical Tumors in Pediatric Patients. A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of a Long Term Follow-up Series. **Cancer**. v.77, n.4, p.771-777. Feb. 15, 1996.
- 6 BEUSCHLEIN, F.; SCHULZE, E.; MORA, P.; GENSHEIMER, H.; MASER-GLUTH, C.; ALLOLIO, B.; REINCKE, M. Steroid 21-Hydroxylase Mutations and 21-Hydroxylase Messenger Ribonucleic Acid Expression in Human Adrenocortical Tumors. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.83, n.7, p.2585-2588, July, 1998.
- 7 BIRCH, J. M.; MARSDEN, H. B.; SWINDELL, R. Incidence of Malignant Disease in Childhood, A 24 Year Review of The Manchester Children's Tumor Registry Data. **British Journal of Cancer**. v.42, p.215-223, 1980.
- 8 BIRCH, J. M.; HARTLEY, A. L.; TRICKER, K. J.; PROSSER, J.; CONDIE, A.; KELSEY, A. M.; HARRIS, M.; JONES, P. H. M.; BINCHY, A.; CROWTHER, D.; CRAFT, A. W.; EDEN, O. B.; EVANS, D. G. R.; THOMPSON, E.; MANN, J. R.; MARTIN, J.; MITCHELL, E. L. D.; SANTIBÁÑEZ-KOREF, M. F. Prevalence and Diversity of Constitutional Mutations in the p53 Gene among 21 Li-Fraumeni Families. **Cancer Research**. v.54, p.1298-1304, Mar. 1, 1994.
- 9 BRUGIÈRES, L.; GARDES, M.; MOUTOU, C.; CHOMPRET, A.; MERESSE, V.; MARTIN, A.; POISSON, N.; FLAMANT, F.; BONAITI-PELLIÉ, C.; LEMERLE, J.; FEUNTEUN, J. Screening for Germ Line p53 Mutations in Children with Malignant Tumors and a Family History of Cancer. **Cancer Research**. v.53, p.452-455, Feb. 1, 1993.
- 10 CARIELLO, N. F.; CUI, L.; BEROUD, C. M.; SOUSSI, T. Database and Software for the Analysis of Mutations in the Human p53 Gene. **Cancer Research**. v.54, p.4454-4460, Aug 15, 1994.

- 11 CASEY, G.; LOPEZ, M. E.; RAMOS, J. C.; PLUMMER, S. J.; ARBOLEDA, M. J.; SHAUGHNESSY, M.; KARLAN, B.; SLAMON, D. J. DNA Sequence Analysis of Exons 2 Through 11 and Immunohistochemical Staining are Required to Detect All Known p53 Alterations in Human Malignancies. **Oncogene**. v.13, p.1971-1981, 1996.
- 12 CASTRO, F.; ISA, W.; AGUERA, L.; COSTA, D. R.; ABAD, J. I.; ROBLES, J. E.; ZUDAIRE, J. J.; BERIAN, J. M. Carcinoma Suprarrenal Primario. **Actas Urológicas Españolas**. v.17, p.30-34, 1993.
- 13 CHEN, P.; CHEN, Y.; BOOKSTEIN, R.; LEE, W. Genetic Mechanisms of Tumor Suppression by the Human p53 Gene. **Science**. v.250, p.1576-1580, Dec. 14, 1990.
- 14 CHI, S.; WHITE, R. W.; MEYERS, F. J.; SIDERS, D. B.; LEE, F.; GUMERLOCK, P. H. P53 in Prostate Cancer, Frequent Expressed Transition Mutations. **Journal of National Cancer Institute**. v.86, n.12, p.926-933, June 15, 1994.
- 15 CIBAS, E. S.; MEDEIROS, L. J.; WEINBERG, D. S.; GELB, A. B.; WEISS, L. M. Cellular DNA Profiles of Benign and Malignant Adrenocortical Tumors. **The American Journal of Surgical Pathology**. v. 14, n. 10, p. 948-955, Oct., 1990.
- 16 COULTER, L. K.; WOLBER, R.; TRON, V. A. Site-Specific Coparison of p53 Immunostaining in Squamous Cell Carcinoma. **Human Pathology**. v.26, n5, p531-533, May 1995.
- 17 CRUCITTI, F.; BELLANTONE, R.; FERRANTE, A; BOSCHERINI, M.; CRUCITTI, P.; ACC ITALIAN REGISTRY STUDY. The Italian Registry for Adrenal Cortical Carcinoma, Analysis of a Multiinstitutional Series of 129 Patients. **Surgery**. v.119, n.2, p.161-170, Feb. 1996.
- 18 DICTCHEKENIAN V.; SETIAN N.; DAMIANI D., DELLA MANA T.; ALVES V.A.F.; LONGATTO FILHO A.; KANAMURA C.T. Adrenal cortex Neoplasm, Immunohistochemical expression of the p53 Gene and Ki67 Nuclear Antigen. Abstract of 5th Joint of Meeting of the ESPE and LWPES. **Hormone Research**. v.48 (suppl 2), p.103, 1997.
- 19 DOCKHORN-DWORNICZAK, B.; WOLFF, J.; POREMBA, C.; SCHÄFER, K. L.; RITTER, J.; GULLOTA, F.; JÜRGENS, H.; BÖCKER, W. A New Germline TP53 Gene Mutation in a Family With Li-Fraumeni Syndrome. **European Journal of Cancer**. v.32, n.8, p.1359-1365, 1996.
- 20 EDGREN, M.; ERIKSSON, B.; WILANDER, E.; WESTLIN, J. E.; NILSSON, S.; ÖBERG, K. Biological Characteristics of Adrenocortical Carcinoma, A Study of p53, IGF, EGF-r, Ki-67 and PCNA in 17 Adrenocortical Carcinomas. **Anticancer Research**, v.17, p.1303-1310, 1997.
- 21 EPELMAN, S; GORENDER, E F.; CASTRO, A.; BIANCHI, A.; CAMARGO A. C. High Incidence of Childhood Adrenocortical Carcinomas in São Paulo. **Medical of Pediatric Oncology**. v.19, n.5, p.400, 1991.
- 22 EVANS, H. L; VASSILOPOULOU-SELLIN, R. Adrenal Cortical Neoplasms. A Study of 56 Cases. **American Journal of Clinical Pathology**. v.105, n.1, p.76-86, Jan. 1996.
- 23 FEDERICI, S.; GALLI, G.; CECCARELLI, P. L.; FERRARI, M.; CICOGNANI A.; CACCIARI, E.; DOMINI, R. Adrenocortical Tumors in Children, A Report of 12 Cases. **European Journal Pediatric Surgery**. v.4, p21-25, 1994.
- 24 FOGT, F.; VARGAS, P.; ZHUANG, Z.; MERINO, M. J. Utilization of Molecular Genetics in the Differentiation Between Adrenal Cortical Adenomas and Carcinomas. **Human Pathology**. v.29, n.5, p.518-521, May, 1998.

- 25 FREBOURG, T.; BARBIER, N.; YAN, Y.; GARBER, J. E.; DREYFUS M.; FRAUMENI, J. Jr.; LI, F. P.; FRIEND, S. H. Germ-line p53 Mutations in 15 Families with Li-Fraumeni Syndrome. **American Journal Human Genetic.** v.56, n.3, p.608-615, 1995.
- 26 FROMENTEL, C. C; SOUSSI, T. TP53 Tumor Suppressor Gene, A model for Investigating Human Mutagenesis. **Genes Chromossom of Cancer.** v.4, p.1-15, 1992.
- 27 GARABRANT, D. H.; HELD, J.; LANGHOLZ, B.; PETERS, J. M.; MACK, T.M. DDT and Related Compounds and Risk of Pancreatic Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* v 84, n10, p.764-771, May 20, 1992.
- 28 GARBER, J. E.; GOLDSTEIN, A.M.; KANTOS, A. F.; DREYFUS, M. G.; FRAUMENI Jr, J. F.; LI, F. P. Follow-up Study of Twenty-four Families with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Research.* v.51, p.6094-6097, Nov. 15, 1991.
- 29 GICQUEL, C.(1); BAUDIN, E.; LEBouc, Y.; SCHLUMBERGER, M. Adrenocortical Carcinoma. *Annals of Oncology.* v.8, p.423-427, May, 1997.
- 30 GICQUEL, C.(2); RAFFIN-SANSON, M.; GASTON, V.; BERTAGNA, X.; PLOUIN, P.; SCHLUMBERGER, M.; LOUVEL, A.; LUTON, J.; BOUC, Y. Structural and Functional Abnormalities at 11p15 Are Associated with the Malignant Phenotype in Sporadic Adrenocortical Tumors, Study on a Series of 82 Tumors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** v.82, n.8, p.2559- 2565, 1997.
- 31 GICQUEL, C.; BERTAGNA, X; LE BOUC, Y. Recent advances in pathogenesis of adrenocortical tumors. **European Journal of Endocrinology.** n.133, p.133-144, 1995.
- 32 GRAYSON, G. H.; MOORE, S.; SCHNEIDER, B. G.; SALDIVAR, V.; HENSEL, C. H. Novel Germline Mutation of p53 Tumor Suppressor Gene in a Child with Incidentally Discovered Adrenal Cortical Carcinoma. **American Journal of Pediatric Hematology/Oncology.** v.16, n.4, p.341-337, 1994.
- 33 GREENBLATT, M. S.; BENNETT, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene, Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. **Cancer Research.** v.54, p.4855-4878, Sept. 15, 1994.
- 34 HARTLEY, A. L.; BIRCH, J. M.; MARDSEN, H. B.; REID, H.; HARRIS, M., BLAIR, V. Adrenal cortical tumours, epidemiological and familial aspects. **Archives of Disease in Childhood.** v.62, p.683-689, 1987.
- 35 HENRY, I.; GRANDJUAN, S.; COULLIN, P.; BARICHARD, F.; HUERRE-JEANPIERRE, C.; GLASER, T.; PHILIP, T.; LENOIR, G.; CHAUSSAIN, J.L., JUNIEN, C. Tumor-specific Loss of 11p15.5 Alleles in del11p13 Wilms Tumor and in Familial Adrenocortical Carcinoma. **Proc. National Academy of Science USA.** v.86, p.3247-3251, May, 1989.
- 36 HENRY, I.; JEANPIERRE, M.; COULLIN, P.; BARICHARD, F.; SERRE, J.; JOURNEL, H.; LAMOUREUX, A.; TURLEAU, C.; GROUCHY, J.; JUNIEN, C. Molecular Definition of the 11p15.5 Region Involved in Beckwith-Wiedemann Syndrome and Probably in Predisposition to Adrenocortical Carcinoma. **Human Genetic.** v.81, p.237-277, 1989.
- 37 HOLCOMBE, J. H.; PYSHER, T. J., KIRKLAND, R. T. Functioning Adrenocortical Tumors in Childhood. In., HUMPHREY, G. B.; GRINDEY, G. B.; DEHNER, L. P. **Adrenal and endocrine tumors in children. Adrenal Cortical Carcinoma and Multiple Endocrine Neoplasia.** Boston, Martinus Nijhoff Publishers, p.277-290, 1984.

- 38 HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS, C. C. p53 Mutations in Human Cancers. **Science**. v.253, p.49-53, July 5, 1991.
- 39 HOLLSTEIN, M. C.; WILD, C. P.; BLEICHER, F.; CHUTIMATAEWIN, S.; HARRIS, C.C.; SRIVATANAKUL, P.; MONTESANO, R. p53 Mutations and Aflatoxin B1 Exposure in Hepatocellular Carcinoma Patients from Thailand. **International Journal of Cancer**. v.53, p51-55, 1993.
- 40 HORIO, Y.; SUZUKI, H.; UEDA, R.; KOSHIKAWA, T.; SUGIURA, T.; ARIYOSHI, Y.; SHIMOKATA, K.; TAKAHASHI, T.; TAKAHASHI, T. Predominantly Tumor-Limited Expression of a Mutant Allele in a Japanese Family Carrying a Germline p53 Mutation. **Oncogene**. n.9, p. 1231-1235, 1994.
- 41 HSU, I. C.; METCALF, R. A.; SUN T.; WELSH J. A.; WAING N. J.; HARRIS C. C. Mutation Hotspot in the p53 Gene in Human Hepatocellular Carcinoma. **Nature**. v.350, p.426-428, Apr. 1991.
- 42 JARESCH, S.; KORNELY, E.; KLEY, H.; SCHLAGHECKE, R. Adrenal Incidentaloma and Patients with Homozygous or Heterozygous Congenital Adrenal Hyperplasia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.74, n.3, p.685-689, Mar., 1992.
- 43 KASPERLIK-ZALUSKA, A.; MIGDALSKA, B. M.; ZGLICZYNSKI, S.; MAKOWSKA, A. M. Adrenocortical Carcinoma. A Clinical Study and Treatment Results of 52 Patients. **Cancer**. v.75, n.10, p.2587-2591, 1995.
- 44 KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOLGELSTEIN, B.; CRAIG, R. W. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. **Cancer Research**, v.51, p.6304-6311, Dec. 1, 1991.
- 45 KIMURA, E., ARMELIN, H. A. Role of Proto-Oncogene c-Ki-ras Amplification and Overexpression in the Malignancy of Y-1 Adrenocortical Tumor Cells. **Brazilian Journal Medicine Biologic Research**. v.21, p.189-201, 1988.
- 46 KLEIHUES, P.; SCHÄUBLE, B.; HAUSEN, A.; ESTÈVE, J.; OHGAKI, H. Tumors Associated with p53 Germiline Mutations. A Synopsis of 91 Families. **American Journal of Pathology**. v.150, n.1, p.1-13, Jan. 1997.
- 47 KOVAR, H.; AUINGER, A.; JUNGER, G.; MULLER, T.; PILLWEIN, K. P53 Mosaicism with an Exon 8 Germiline Mutation in the Founder of a Cancer-Prone Pedigree. **Oncogene**. n.7, p.2169-2173, 1992.
- 48 KRESS, S.; SUTTER, C.; STRICKLAND, P. T.; MUKHTAR, H.; SCWEIZER, J.; SCHWARZ, M. Carcinogen-Specific Mutational Pattern in the p53 Gene in Ultraviolet B Radiation-induced Squamous Cell Carcinomas of Mouse Skin. **Cancer Research**. v.52, p.6400-6403, Nov. 15, 1992.
- 49 KUMAR, T. R.; DONEHOWER, L. A.; BRADLEY, A.; MATZUK, M. M. Transgenic mouse models for tumor-suppressor genes. **Journal of Internal Medicine**. v.238, p.233-238, 1995.
- 50 LACK, E. E. **Atlas of Pathology. Tumors of the adrenal Gland and Extra-Adrenal Paraganglia**. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1997.
- 51 LACK, E. E.; MULVIHILL, J. J.; TRAVIS, W. D.; KOZAKEWICH, H. P. W. Adrenal Cortical Neoplasms in the Pediatric and Adolescent Age Group. Clinicopathologic Study of 30 Cases with Emphasis on Epidemiological and Prognostic Factors. In, ROSEN, P. P.; FECHNER, R. E.; LANGE, A. A. **Pathology Annual. Part 1**. v.27, p.1-53, 1992.

- 52 LAW, J. C.; STRONG, L. C.; CHIDAMBARAM, A.; FERREL, R. E. A Germ Line Mutation in Exon 5 of the p53 Gene in an Extended Cancer Family. **Cancer Research**. v.51, p.6385-6387, Dec. 1991.
- 53 LECOINTRE, C.; LATOUCHE, J.; BACHY, B.; BRUGIÈRES, L.; MALLET, E.; TRON, P.; FREBOURG, T. A new Case of Li-Fraumeni Syndrome Revealed by a Sporadic Adrenocortical Carcinoma. Abstract of 5th Joint of Meeting of the ESPE and LWPES. **Hormone Research**. v.48, (suppl 2) p.103, 1997.
- 54 LEVINE, A.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumor supressor gene. **Nature**. v.351, n.6, p.453-456, June, 1991.
- 55 LEVINE, G. W. Adrenocortical Carcinoma in Two Children With Subsequent Primary Tumors. **American Journal of Disease of Children**. v.132, p.238-240, Mar., 1978.
- 56 LEWIN, B *GENES VI*. Oxford University. Oxford, p. 10, 76-77, 1122-6, 1162-71, 1997.
- 57 LI, F. P.; FRAUMENI, J. F. Soft-Tissue Sarcomas, Breast Cancer, and Other Neoplasms. A Familial Syndrome? **Annals of Internal Medicine**. v.71, n.4, p.747-752, Oct., 1969.
- 58 LI, F. P.; FRAUMENI Jr, J. F.; MULVIHILL, J. J.; BLATTNER, W. A.; DREYFUS, M. G.; TUCKER, M. A.; MILLER, R. W. A Cancer Family Sindrome in Twenty-four Kindreds. **Cancer Research**. v.48, p.5358-5362, Sept. 15, 1988.
- 59 LIN, S. R.; TSAI, J. H.; YANG, Y. C.; LEE, S. C. Mutations of K-ras Oncogene in Human Adrenal Tumours in Taiwan. *British Journal of Cancer*. v.77, n.7, p.1060-1065, 1998.
- 60 LIN, S.; LEE, Y.; TSAI, J. Mutation of the p53 Gene in Human Functional Adrenal Neoplasms. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.78, n.2, p.483-491, 1994.
- 61 LYNCH, H. T.; KATZ, D. A.; BOGARD, P. J.; LYNCH, J. F. The Sarcoma, Breast Cancer, Lung Cancer, and Adrenocortical Carcinoma Syndrome Revisited. **American Journal of Disease of Children**. v.139, p.134-136, Feb. 1985.
- 62 MALÉCOT, G. **Les Mathématiques de L'Hérédité**. Masson et Cie. Paris, 1948. 61 páginas.
- 63 MALKIN, D.; LI, F. P.; STRONG, L. C.; FRAUMENI, J. F.; NELSON, C. E.; KIM, D. H.; KASSEL, J.; GRYKA, M. A.; BISCHOFF, F. Z.; TAINSKY, M. A.; FRIEND, S. H. Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcomas, and other Neoplasms. **Science**. v.250, p.1233-1238, 1990.
- 64 MALKIN, D.; LI, F. P. Genetic Defect Identified in Rare Cancer Syndrome. **Science**. v.250, p.1232-1233, 1990.
- 65 MARIGO, C.; MULLER, H.; DAVIES, J. N. P. Survey of Cancer in Children Admitted to a Brazilian Charity Hospital. **Journal of the National Cancer Institute**. v.43, n.6, Dec., 1969.
- 66 MAYER, S. K.; OLIGNY, L. L.; DEAL, C.; YAZBECK, S.; GAGNÉ, N.; BLANCHARD, H. Childhood Adrenocortical Tumors, Case Series and Reevaluation of Prognosis - A 24 Year Experience. **Journal of Pediatric Surgery**. v.32, n.6, p.911-915, 1997.

- 67 McNICOL, A. M.; NOLAN, C. E.; STRUTHERS, A. J.; FARQUHARSIN, M. A.; HERMANS, J.; HAAK, H. R. Expression of p53 in adrenocortical tumors, Clinicopathological Correlations. **Journal of Pathology**. v.181, p.146-152, 1997.
- 68 McWHIRTER, W. R.; STILLER, C. A.; LENNOX, E. L. Carcinomas in Childhood. A Registry-based Study of Incidence and Survival. **Cancer**. v.63, p.2242-2246, June, 1989.
- 69 MENDONÇA, B. B.; LUCON, A. M.; MENEZES, C. A. V.; SALDANHA, L. B.; LATRONICO, A. C.; ZERBINI, C.; MADUREIRA, G.; DOMENICE, S.; ALBERGARIA, M. A. P.; CAMARGO, M. H. A.; HALPERN, A.; LIBERMAN, B.; ARNHOLD, I. J. P.; BLOISE, W.; ANDRIOLO, A.; NICOLAU, W.; SILVA, F. A. Q.; WROCLASKI, E.; ARAP, S.; WAJCHENBERG, B. L. Clinical, Hormonal and Pathological Findings in a Comparative Study of Adrenocortical Neoplasms in Childhood and Adulthood. **Journal of Urology**. v.154, p.2004-2009, Dec., 1995.
- 70 MICHALKIEWICZ, E. L.; SANDRINI, R.; BUGG, M. F.; CRISTOFANI, L.; CARAN, E.; CARDOSO, A. M. S.; LACERDA, L.; RIBEIRO, R. Clinical Characteristics of Small Functioning Adrenocortical Tumors in Children. **Medical and Pediatric Oncology**. v.28, p.175-178, 1997.
- 71 MILLER, R. W. Frequency and Enviromental Epidemiology of Childhood Cancer. In: PIZZO, P.H.; POLLACK, D.G. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. Philadelphia: J.B. Lippincott. p.3-18, 1989.
- 72 MORALES, L.; ROVIRA, J.; ROTTERMANN, M.; JULIÁ, V. Adrenocortical Tumors in Childhood, A Report of Four Cases. **Journal of Pediatric Surgery**. v.24, n.3, p.276-281, 1989.
- 73 NIGRO, J. M.; BAKER, S. J.; PREISINGER, A. C.; JESSUP, J. M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S. H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILEE, P.; GLOVER, T.; COLLINS, F. S.; WESTON, A.; MODALI, R.; HARRIS, C. C.; VOGELSTEIN, B. Mutations in the p53 Gene occur in Diverse Human Tumor Types. **Nature**. v.342, p.705-708, Dec. 7, 1989.
- 74 OHGAKI, P.; KLEIHUES, P.; HEITZ, P. U. p53 Mutations in Sporadic Adrenocortical Tumors. **Int. J. Cancer**. v.54, p.408-410, 1993.
- 75 OZTURK, M. & COLLABORATORS. P53 Mutation in Hepatocellular Carcinoma after Aflatoxin Exposure. **Lancet**. v.338, p.1356-1359, Nov. 30, 1991.
- 76 PLUMMER, S. J.; SANTIBAÑEZ-KOREF, M.; KUROSAKI, T.; LIAO, S.; NOBLE, B.; FAIN, P. R.; ANTON-CULVER, H.; CASEY, G. A Germline 2.35 kb Deletion of p53 Genomic DNA Creating a Specific Loss of the Oligomerization Domain Inherited in a Li-Fraumeni Syndrome Family. **Oncogene**. n.9, p.3273-3280, 1994.
- 77 PRITCHARD-JONES, K. Genetics of Childhood Cancer. **British Medical Bulletin**. v.52, n.4, p.704-723, 1996.
- 78 QUESNEL, S.; MALKIN, D. Genetic Predisposition to Cancer and Familial Cancer Syndromes. **Pediatrics Clinics of North America**. v.44, n.4, p.791-808, Aug. 1997.
- 79 REINCKE, M.; KARL, M.; TRAVIS, W. H.; MASTORAKOS, G.; ALLOLLIO, B.; LINEHAN, M.; CHROUSOS, G. P. P53 Mutations in Human Adrenocortical Neoplasms Immunohistochemical and Molecular Studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.78, n.3, p.790-794, 1994.

- 80 REINCKE, M.; WACHENFELD, C.; MORA, P.; THUMSER, A.; JAURSH-HANCKE, C.; ABDELHAMID, S.; CHROUSOS, G. P.; ALLOLIO, B. p53 Mutation in Adrenal Tumors, Caucasian Patients Do Not Show the Exon 4 "Hot Spot" Found in Taiwan. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.81, n.10, p.3636-3638, 1996.
- 81 RIBEIRO, R. C.; SANDRINI, R.; SCHELL, M. J.; LACERDA, L.; SAMBAIO, G. A.; CAT, I. Adrenocortical Carcinoma in Children, A Study of 40 Cases. **Journal of Clinical Oncology**. v. 8, n.1, p.67-74, Jan. 1990.
- 82 SAEKI, Y.; TAMURA, K.; YAMAMOTO, Y.; HATADA, T.; FURUYAMA, J.; UTSUNOMIYA, J. Germline p53 Mutation t Codon 133 in a Cancer-Prone Family. **Journal of Molecular Medicine**. v.75, n.1, p 50-56, Jan. 1997.
- 83 SAMESHIMA, Y.; TSUNEMATSU, Y.; WATANABE, S.; TSUKAMOTO, T.; KAWA-HA, K.; HIRATA, Y.; MIZOGUCHI, H.; SUGIMURA, T.; TERADA, M.; YOKOTA, J. Detection of novel Germ-line p53 Mutations in Diverse-Cancer-Prone Families Identified by Selecting Patients with Childhood Adrenocortical Carcinoma. **Journal of National Cancer Institute**. v.84, p.703-707, 1992.
- 84 SANDRINI NETO, R. Tumor de Córtex da Supra-Renal na Infância. Estudo de 58 Pacientes. Tese apresentada para concurso de Professor Titular de Pediatria, Clínica Pediátrica, Departamento de Pediatria, Setor de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. p. 60-61, 1993.
- 85 SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; De LACERDA, L. Childhood Adrenocortical Tumors. **Journal Clinics of Endocrinology and Metabolism**. v.82, n.7, p.2027-2031, Aug., 1997.
- 86 SANTIBAÑEZ-KOREF, M. F.; BIRCH, J. M.; HARTLEY, A. L.; JONES, P. H. M.; CRAFT, A. W.; EDEN, T.; CROWTHER, D.; KELSEY, A. M.; HARRIS, M. p53 germline mutations in Li-Fraumeni syndrome. **Lancet**. v.338, p.1490-1491, Dec.1991.
- 87 SCHATZKIN, A.; GOLDSTEIN, A.; FREEDMAN, L. S. What Does It Mean to Be a Cancer Gene Carrier? Problems in Establishing Causality From the Molecular Genetics of Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v.87, n.15, p.1126-1130, Aug. 2, 1995.
- 88 SEDLACEK, Z.(1); KODET, R.; SEEMANOV, E.; VODVARKA, P.; WILGENBUS, P.; MARES, J.; POUSTKA, A.; GOETZ, P. Two Li-Fraumeni Syndrome Families with Novel Germline p53 Mutations, Loss of the Wild-Type p53 Allele in Only 50% of Tumours. **British Journal of Cancer**. v.77, n.7, p.1034-1039, 1998.
- 89 SEDLACEK, Z.(2); KODET, R.; POUTSKA, A.; GOETZ, P. A Database of Germline p53 Mutations in Cancer-Prone Families. **Nucleic Acids Research**. v.26, n.1, p.214-215, 1998.
- 90 SHAULSKY, G.; GOLDFINGER, N.; ROTTER, V. Alterations in Tumor Development *in Vivo* Mediate by Expression of Wild Type or Mutant p53 Proteins. **Cancer Research**. v.51, p.5232-5237, Oct. 1991.
- 91 SØREIDE, J. A.; BRABRAND, K.; THORESEN, S. Ø. Adrenal Cortical Carcinoma in Norway, 1970-1984. **World Journal of Surgery**. v.16, n.4, p.663-668, Jul./Aug. 1992.
- 92 SOUSSI, T.; MAY, P. Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution, A Second Look. **Journal of Molecular Biology**. v.260, n.5, p.623-627, Aug. 1996.

- 93 SOUSSI, T.; LEGROS, Y.; LUBIN, R.; ORY, K.; SCHLICHTHOLZ, B. Multifactorial Analysis of p53 Alterations in Human Cancer, A Review. **International Journal of Cancer**. v.57, p.1-9, 1994.
- 94 SRIVASTAVA, S.; ZHIQIANG, Z.; PIROLLO, K.; BLATTNER, W.; CHANG, E. H. Germ-line Transmission of Mutated p53 Gene in a Cancer-prone Family with Li-Fraumeni Syndrome. **Nature**. v.348, p.747-749, Dec. 20/27, 1990.
- 95 STILLER, C. A., PARKIN, D. M. Geographic and Ethnic Variations in the Incidence of Childhood Cancer. **British Medical Bulletin**. v.52, n.2, p.682-0703, 1996.
- 96 STILLER, C. A. Aetiology and Epidemiology. In: PLOWMAN, P. N.; PINKERTON, C. R. **Paediatric Oncology. Clinical Practice and Controversies**. Chapman & Hall Medical. Londres. 1992
- 97 STOLZENBERG, M.; BRUGIÈRES, L.; GARDES, M.; DESSARPS-FREICHEY, F.; CHOMPRET, A.; BRESSAC, B.; LENOIR, G.; BONAÏTI-PELLIÉ, C.; LEMERLE, J.; FEUNTEUN, J. Germ-line Exclusion of a Single P53 Allele by Premature Termination of Translation in a Li-Fraumeni Syndrome Family. **Oncogene**. v.9, p.2799-2804, 1994.
- 98 STRAUSS, E. A.; HOSLER, M. R.; HERZOG, P.; SALHANY, K.; LOUIE, R.; FELIX, C. A. Complex Replication Error Causes p53 Mutation in a Li-Fraumeni Family. **Cancer Research**. v.55, p.3237-3241, Aug. 1, 1995.
- 99 STÜRZBECHER, H.; BRAIN, R.; ADDISON, C.; RUDGE, K.; REMM, M.; GRIMALDI, M.; KEENAN, E.; JENKINS, J. A C-Terminal α -Helix Plus Basic Region Motif is the Major Structural Determinant of p53 Tetramerization. **Oncogene**. v.7, p.1513-1523, 1992.
- 100 TANK, E. S.; KAY, R. Neoplasm Associated With Hemihypertrophy, Beckwith-Wiedemann Syndrome and Anidria. **The Journal of Urology**. v.124, p.266-268, Aug., 1980.
- 101 TENOUTASSE, S.; FERSTER, A.; HEIMAN, P.; VARUMBEKE, M.; GICQUEL, C.; SARIBAN, E.; HEINRICHS, C. Adrenocortical Carcinoma, Mutation of p53 Gene and Loss of Heterozigosity of 11p15 Locus on tumoral Tissue. Abstract of 5th Joint of Meeting of the ESPE and LWPES. **Hormone Research**. v.48, (suppl 2), p.102, 1997.
- 102 TERAMOTO, T.; SATONAKA, K.; KITAZAWA, S.; FUJIMORI, T.; HAYASHI, K.; MAEDA, S. p53 Gene Abnormalities Are Closely Related to Hepatoviral Infections and Occur at a Late Stage of Hepatocarcinogenesis. **Cancer Research**. v.54, p.231-235, Jan. 1, 1994.
- 103 TOGUCHIDA, J.; YAMAGUCHI, T.; DAYTON, S. H.; BEAUCHAMP, R. L.; HERRERA, G. E.; ISHIZAKI, K.; YAMAMURO, T.; MEYERS, P. A.; LITTLE, J. B.; SASAKI, M. S.; WEICHSELBAUM, R. R.; YANDELL, D. W. Prevalence and Spectrum of Germline Mutations of the p53 Gene Among Patients with Sarcoma. **The New England Journal of Medicine**. v.326, n.20, p.1301-1308, May 14, 1992.
- 104 TOMATIS, L.; NAROD, S.; YAMASAKI, H. Transgeneration transmission of carcinogenic risk. **Carcinogenesis**. v.13, n.2, p.145-151, 1992.
- 105 TSUKAMOTO, T.; KUMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, A.; AKAGASHI, K.; ITOH, N.; NANBU, A.; SATO, M. Adrenocortical Carcinoma in a Child with Specific Pedigree of Family Associated with Cancer Aggregation. **The Journal of Urology**. v.147, p.104-106, Jan., 1992.

- 106 TSUNEMATSU, Y.; WATANABE, S.; OKA, T.; TSUKAMOTO, T.; KAWA-HÁ, K.; HIRATA, Y.; YAMANAKA, H.; OHIRA, M.; ONO, M. Familial Aggregation of Cancer from Proband Cases with Childhood Adrenal Cortical Carcinoma. **Japan Journal of Cancer Research**. v.82, p.893-900, Aug. 1991.
- 107 VARGAS, M. P.; VARGAS, H. I.; KLEINER, D. E.; MERINO, M. J. Adrenocortical Neoplasms, Role of Prognostic Markers MIB-1, p53 and RB. **The American Journal of Surgical Pathology**. v.21, n.5, p.556-562, 1997.
- 108 VARLEY, J. M.; MCGOWN, G.; THORNCROFT, M.; COCHRANE, S.; MORRISON, P.; WOLL, P.; KELSEY, A. M.; MITCHELL, E. L. D.; BOYLE, J.; BIRCH, J.M.; EVANS, D. G. R. A Previously Undescribed Mutation Within the Tetramerisation Domain of TP53 in a Family with Li-Fraumeni Syndrome. **Oncogene**. v.12, p.2437-2442, 1996.
- 109 VARLEY, J. M.(1); MCGROWN, G.; THORNCROFT, M.; SANTIBANEZ-KOREF M. F.; KELSEY, A. M.; TRICKER, K. J.; EVANS, D. G. R.; BIRCH, J. M. Germline mutations of TP53 in Li-Fraumeni Families, An Extended Study of 39 Families. **Cancer Research**. v.57, p.3245-3252, Aug. 1, 1997.
- 110 VARLEY, J. M.(2); THORNCROFT, M.; MCGOWN, G.; APPLEBY, J.; TRICKER, K. J.; EVANS, D. G. R.; BIRCH, J. M. A Detailed Study of Loss of Heterozygosity on Chromosome 17 in Tumours from Li-Fraumeni Patients Carrying a Mutation to the TP53 Gene. **Oncogene**. v.14, p.865-871, 1997.
- 111 WAGNER, J.; PORTWINE, C.; RABIN, K ; LECLERC, J.; NAROD, S. A; MALKIN, D. High Frequency of Germiline p53 Mutations in Childhood Adrenocortical Cancer. **Journal National of Cancer Institute**. v.86, n.22, p.1707-1710, Nov., 16, 1994.
- 112 WANG, Y.; PRIVES, C. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. **Nature**. v.376, n.6, p.88-91, July 1995.
- 113 YOUNG Jr., J. L.; RIES, L. G.; SILVERBERG, E.; HORM, J. W.; MILLER, R. W. Cancer incidence, Survival, and Mortality for Children Younger Than Age 15 Years. **Cancer**. v.58, Supplement, p. 598-602, July 15, 1986.
- 114 ZOGRAFOS, G. C.; DRISCOLL, D. L.; KARAKOUSIS, C. P.; HUBEN, R. P. Adrenal Adenocarcinoma, A Review of 53 Cases. **Journal of Surgical Oncology**. v.55, n.3, p.160-164, March, 1994.